Untersuchungen zur Anwendung der RAMAN-Spektroskopie in der Medizin

von

Hansjörg Albrecht

aus

Stuttgart

1976 № 425

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548424_0016

Untersuchungen zur Anwendung der RAMAN-Spektroskopie in der Medizin

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung desDoktorgrades

vorgelegt
von
Hansjörg Albrecht
aus
Stuttgart

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Forschungsgebiet der Biomedizinischen Technik umfaßt nicht nur die Entwicklung neuer Therapeutika, sondern auch die Verbesserung der klinischen Analytik durch die Anwendung und Weiterentwicklung neuer Analyseverfahren. Der Bedarf an Meßverfahren für eine schnelle, kontinuierliche in vivo Überwachung vieler Stoffwechselprodukte in der klinischen Diagnostik, in der Intensivpflege und in der Präventivmedizin führte zur Untersuchung der Eigenschaften der RAMAN-Streuung in natürlichen Körperflüssigkeiten und Gasgemischen. Das Ziel lag dabei in der Klärung der Frage, inwieweit sich dieses Verfahren auch für klinische Analysen einsetzen läßt.

Dazu wurden das Streuverhalten der diagnostisch interessanten Substanzen und der Einfluß verschiedener Meßsystemkomponenten auf die spezifische Nachweisempfindlichkeit ermittelt. Die Entwicklung der Streuanordnungen für die Untersuchungen an wässrigen Lösungen, an strömendem Blut und an Gasmischungen sowie eines digitalen Datenerfassungssystems bildeten die Voraussetzung für die Messungen mit einem hochauflösenden Spektrometer. Die Auswertung der fluoreszenzüberlagerten Resonanz-RAMAN-Spektren von Citratblut erfolgte mit einer numerischen Kurvenanalyse.

Die Entwicklung einer digitalen Steuer- und Meßelektronik bildete die Grundlage der experimentellen Untersuchungen für die Konstruktion eines festfrequenten Interferenzfilterpolychromators zur Simultanregistrierung mehrerer Mischungsbestandteile und für den Aufbau eines einfachen Meßsystems für Atemgasanalysen. Dabei konnten die optische Nachweisempfindlichkeit um mehr als eine Größenordnung und der Feasibility Index um etwa zwei Größenordnungen gesteigert werden. Mit Hilfe eines künstlichen Blutkreislaufs konnten erstmals reproduzierbare Resonanz-RAMAN-Spektren von Hämoglobin in menschlichem Blut natürlicher Zusammensetzung registriert und der Vorgang der

Oxygenation kontinuierlich erfaßt werden. Als besonders vorteilhaft erwies sich in Hinblick auf eine klinische Anwendung die Bestimmung normierter Konzentrationswerte, wobei charakteristische RAMAN-Linien der Gesamtkonzentration als Bezugswerte dienten.

Im Einzelnen wurden bei der Untersuchung der verschiedenen Substanzen folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Nachweisgrenze einiger diagnostisch wichtiger Stoffwechselprodukte in wässriger Lösung ließ sich um ein bis zwei Größenordnungen unter die physiologischen Konzentrationen in Serum und Harn senken. Der direkte Nachweis physiologischer Konzentrationen in den natürlichen Körperflüssigkeiten gelang nur für Harnstoff (ca. 0,4 Mol/l) in Harn mit einer Abweichung von $<10\%$.

2. Die intensive Fluoreszenzstrahlung bei der Lichtstreuung in den natürlichen Körperflüssigkeiten ließ sich bei einigen chromophoren Substanzen, wie Hämoglobin oder Bilirubin, durch Ausnutzen der Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung kompensieren. Für den Nachweis anderer Substanzen wurde der Einsatz eines Membrankatheters diskutiert.

3. Die Sauerstoffsättigung konnte aus den Resonanz-RAMAN-Spektren von strömendem Citratblut in den drei Resonanzbereichen des Hämoglobins ermittelt werden.
   Bei einer Streuanregung mit λ_o = 514,5 nm ließ sich der Konzentrationswert mit Hilfe von drei Linien bei konstantem Fluoreszenzuntergrund als normierte Größe bestimmen.
   Bei einer Streuanregung mit λ_o = 568,2 nm konnte durch Ausnutzen der Polarisationseigenschaften des Streulichts die Konzentrationsänderung des Oxyhämoglobins mit geringem Störeinfluß direkt registriert werden.

4. Mit einem einfachen Meßaufbau gelang es, den zeitlichen Verlauf der einzelnen Atemgaskonzentrationen im Atemrhythmus für O_2, CO_2 und N_2 in vivo zu registrieren.

2. EINLEITUNG

Die RAMAN-Spektroskopie ist ein schwingungsspektroskopisches Analyseverfahren, das die Molekülschwingungen als spezifische Eigenschaft zur Bestimmung der Zusammensetzung von Mischungen, der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen und der Molekülstruktur ausnutzt. Durch die geometrische Anordnung und die Art der Bindung bestimmter Atomgruppen im Molekül sind die Molekülschwingungen in Zahl, Symmetrieeigenschaften und Energie festgelegt und lassen sich an Substanzen in den Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, unter welchen Voraussetzungen dieses Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Stoffwechselprodukten für die klinische Diagnostik geeignet ist und bei welchen klinischen Anwendungen dieses Verfahren eine Verbesserung oder Vereinfachung der herkömmlichen Analysemethoden erwarten läßt.

Für die Anregung von Molekülschwingungen kommt neben der RAMAN-Streuung noch die Infrarot-Absorption als weiterer physikalischer Effekt in Frage. Die Anregung einer Molekülschwingung bedeutet eine Änderung der Molekülgesamtenergie und läßt sich als Übergang zwischen verschiedenen Molekülschwingungszuständen deuten. Diese Energiedifferenz läßt sich entweder durch die vollständige Absorption eines entsprechenden Energiequants - dies entspricht der Absorption von Photonen des Infrarot-Bereichs - oder durch die Aufnahme eines Teils eines größeren Energiequants bei einer inelastischen Streuung von Photonen des sichtbaren Spektralbereichs dem Molekül zuführen. In beiden Fällen wird als Meßergebnis direkt oder indirekt die Schwingungsfrequenz ermittelt.

Bei der meßtechnischen Anwendung liegt der Unterschied beider Effekte im verwendeten Spektralbereich der Photonen, die zur

Absorption oder Streuung in die Substanzprobe eingestrahlt werden, und in einem unterschiedlichen Wirkungsquerschnitt. Da biologische Systeme Wasser als Lösungsmittel enthalten, sind durch die intensive IR-Absorption des Wassers die substanzspezifischen Molekülschwingungslinien weitgehend verdeckt. Beim RAMAN-Effekt mit Licht im sichtbaren Spektralbereich spielt dagegen der Störeinfluß des Wassers nur eine untergeordnete Rolle, so daß die inelastische Lichtstreuung bei der Untersuchung biologischer Substanzen trotz des kleineren Wirkungsquerschnittes praktische Bedeutung erlangt. Neben diesen Eigenschaften weist dieses optische Analyseverfahren für die hier untersuchten Anwendungen weitere Vorteile auf, da das Verfahren für die gleichzeitige Analyse verschiedener Substanzen geeignet ist. Die Streulichtintensität ist unter bestimmten Voraussetzungen - keine Änderung der Wechselwirkung oder der optischen Eigenschaften - proportional zur Konzentration der einzelnen Bestandteile. Die Messung erfolgt berührungslos und bei geeigneten Intensitäten zerstörungsfrei ohne eine Verunreinigung der Meßstelle. Die Anregungsstrahlung läßt sich entweder über Lichtleitfasern oder bei Gasen auch direkt an entfernte oder nur schwer zugängliche Meßorte leiten.

Die Anwendungsmöglichkeiten der RAMAN-Spektroskopie waren stets durch den technischen Entwicklungsstand der Meßapparatur bestimmt. Erst die Einführung der Laserlichtquellen zur Streuanregung und der direkten fotoelektrischen Registrierung des Streulichts ermöglichte in den letzten Jahren eine Vielzahl von neuen Anwendungen. Als typisches Beispiel für die Weiterentwicklung der RAMAN-Meßapparatur sei hier die Aufnahme des Gasspektrums von Diäthyläther erwähnt. Die fotografische Aufnahme erforderte 1928 - im Jahr der Entdeckung des RAMAN-Effekts - eine Meßzeit von 184 Stunden (RAMDAS(L1)). Heute läßt sich dieses Spektrum bei einer Streuanregung durch einen Impulslaser in weniger als einer tausendstel Sekunde fotoelektrisch registrieren.

Die Verkürzung der Meßzeit entspricht einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit, die eine Reihe von technischen Anwendungen und den Einsatz in anderen Forschungsbereichen gestattet, wie z.B. bei der Untersuchung biochemischer Reaktionen und biologischer Substanzen. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen werden die Ergebnisse der RAMAN-spektroskopischen Gasanalysen zur Fernmessung von Schadstoffkonzentrationen in der Luft (LIDAR), zur Bestimmung von Temperaturprofilen sowie des Wasserdampfgehaltes der Atmosphäre herangezogen. Hinzu kommt eine Anwendung zur Prozeßüberwachung anhand der Konzentrationen gasförmiger Produkte bei chemischen Reaktionen. Einen Überblick über verschiedene Methoden und Anwendungen der Gasanalyse geben LAPP, PENNEY (L2). Die Übersichtsartikel von SCHRADER (L3), GROSSMAN (L4) und FREEMAN (L5) vermitteln darüberhinaus einen Überblick über die theoretischen und technischen Weiterentwicklungen des Meßverfahrens und über weitere Anwendungen, von denen vor allem die Untersuchungen biologischer Substanzen für diese Arbeit von Bedeutung sind. Die RAMAN-spektroskopische Untersuchung biochemischer Reaktionen, wie der reversiblen O_2-Bindung an das Hämoglobin, des Seh-Vorganges oder der Denaturierung von Proteinen, nutzt die mit biochemischen Prozessen verbundene Strukturänderung der Großmoleküle aus, die zu einer Änderung der Schwingungsfrequenzen führt. Da in vielen Fällen die biochemische Reaktion im Bereich eines biologischen Chromophors, wie Hämgruppe, Flavine, komplexierte Metallionen u.a., abläuft, läßt sich durch die Resonanzverstärkung der Streuung (Resonanz-RAMAN-Effekt) die spezifische Nachweisempfindlichkeit für die Reaktion um einige Größenordnungen steigern.

Trotz der Vielzahl von veröffentlichen Arbeiten über die Untersuchungen an biologischen Substanzen und über verschiedene technische Anwendungen der RAMAN-Streuung sind bisher keine systematischen Anwendungen als Analyseverfahren für

die medizinische Diagnostik bekannt. Ansätze für diese Anwendung stellen die Untersuchungen zur Identifizierung von Medikamenten (Barbiturate) von WILLIS et al. (L6) bzw. die immunochemischen Untersuchungen von CAREY et al. (L7) dar. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb einige Probleme der RAMAN-Streuung in biologischen Systemen mit der Zielsetzung einer klinischen Anwendung beschrieben werden. Von besonderem klinischen Interesse ist dabei die Anwendungsmöglichkeit zur kontinuierlichen und gleichzeitigen in vivo Überwachung der Konzentrationen mehrerer Stoffwechselprodukte. Die Ergebnisse dürften sich jedoch auch auf andere Anwendungen übertragen lassen.

3. GRUNDLAGEN DER UNTERSUCHUNGEN

3.1 Meßverfahren

Die RAMAN-Spektroskopie beruht auf einer Streuung von monochromatischem Licht an den Molekülen der zu untersuchenden Substanz und einer Frequenzanalyse des Streulichtes. Eine quantenmechanische Beschreibung dieses Vorganges und eine Reihe von Näherungslösungen finden sich in der Literatur, z.B. bei PLACZEK (L8) mit einer Näherungslösung für Gase und verdünnte Lösungen sowie in verschiedenen Monografien, z.B. BRANDMÜLLER, MOSER (L9) oder GILSON, HENDRA (L10) u.a. Die Analyse des Streulichts ergibt, daß die Mehrzahl der gestreuten Photonen die Frequenz des eingestrahlten Lichts beibehält (RAYLEIGH-Streuung). Nur ein geringer Teil der Photonen wird durch die Moleküle inelastisch gestreut (RAMAN-Streuung) und erfährt eine Frequenzverschiebung (RAMAN-Frequenz) um ein Energiequant, das einem Molekülübergang entspricht. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen handelt es sich im allgemeinen um Schwingungsübergänge; eine Ausnahme bildet die Beobachtung einzelner, getrennter Rotations-RAMAN-Linien an Gasen.

Das Zustandekommen verschiedener Arten von Schwingungslinien läßt sich anhand der Abb. 1 erklären, die ein Energieniveauschema eines einfachen Moleküls für zwei Hauptquantenzustände ($e = 0$, $e = 1$) zeigt. Diese Niveaus sind wiederum in verschiedene Schwingungszustände, gekennzeichnet durch die Quantenzahl v, und Rotationszustände, gekennzeichnet durch die Quantenzahl J, unterteilt. Das Photon mit der Energie $h\tilde{\nu}_o$ kann bei der Streuung Energie verlieren, dies ergibt STOKESsche RAMAN-Linien, wobei das Molekül in einen höher angeregten Schwingungszustand übergeht, oder beim umgekehrten Übergang Energie vom Molekül aufnehmen, dies ergibt anti-STOKESsche RAMAN-Linien. Da die Besetzung der angeregten Niveaus einer

BOLTZMANN-Verteilung entspricht, nimmt die Wahrscheinlichkeit für anti-STOKESsche Übergänge bei konstanter Temperatur mit zunehmender Frequenzverschiebung $\tilde{\nu}_{nm}$ stark ab. Für ν_{nm}=1000 cm^{-1} und T= 300 K beträgt die Übergangswahrscheinlichkeit <1%.

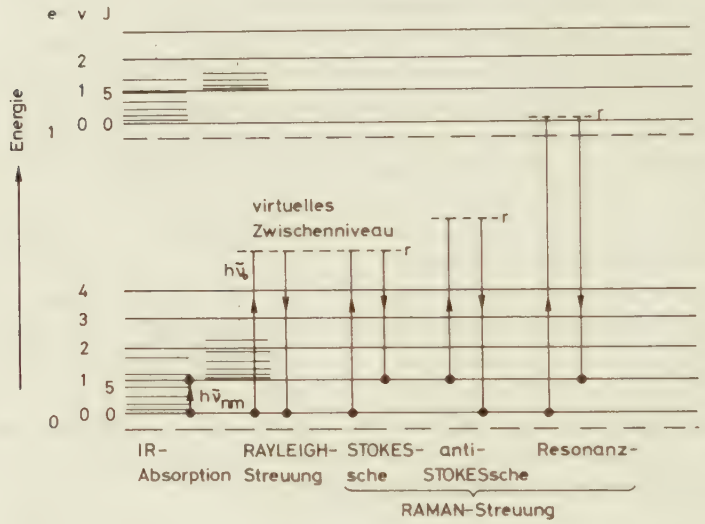


Abb. 1: Energieniveauschema eines einfachen Moleküls; dargestellt sind der Grundzustand(Quantenzahl e=0) und der 1. angeregte Zustand (e=1) mit den Schwingungsniveaus zur Quantenzahl v. Die weitere Aufspaltung in Rotationsniveaus ist angedeutet.
Die verschiedenen Schwingungsübergänge durch Absorption (IR-Absorption) und durch RAMAN-Streuung sind schematisch wiedergegeben; als Ergänzung ist die RAYLEIGH-Streuung mit identischem Anfangsniveau n und Endniveau m - n=m - mit angegeben. Die Energie des eingestrahlten Laserquants ist mit $h\tilde{\nu}_0$ bezeichnet. Im Resonanzfall liegt das virtuelle Zwischenniveau im Bereich der elektronisch angeregten Zustände.

Die Registrierung der Streulichtintensität als Funktion der Frequenz ergibt das RAMAN-Spektrum; die RAMAN-Frequenz*

*Die RAMAN-Frequenz ν wird üblicherweise in "Wellenzahlen" oder $[cm^{-1}]$ angegeben; zur Unterscheidung wird der Frequenzwert mit $\tilde{\nu}$ [1/s] bezeichnet (in Übereinstimmung mit (L9)):
$\nu = 1/\lambda = \tilde{\nu}/c_o$ $[cm^{-1}]$ mit c_o = Vakuumlichtgeschwindigkeit

entspricht der Frequenzverschiebung und wird damit unabhängig von der Anregungsfrequenz. Der Nullpunkt entspricht der RAYLEIGH-Linie. Die Wahl einer Anregungsfrequenz in einem absorptionsfreien Spektralbereich ($\nu_o \ll \nu_e$) führt zur normalen RAMAN-Streuung, strahlt man dagegen im Bereich einer elektronischen Absorptionsbande mit der Frequenz ν_e der Substanz ein ($\nu_o \approx \nu_e$), so erfährt die Intensität der RAYLEIGH-Linie und der RAMAN-Linien bestimmter Schwingungsübergänge eine Resonanzverstärkung. In diesem Fall liegt das virtuelle Zwischenniveau r im Bereich des elektronisch angeregten Zustandes ($e = 1$). Dies bedeutet, daß sich für bestimmte Schwingungszustände des Grundniveaus, deren Eigenfunktionen mit der des angeregten Zustandes überlappen, die Übergangswahrscheinlichkeit erhöht (L9). Neben der Resonanz-RAMAN-Streuung treten auch Absorption und nachfolgende Fluoreszenz auf.

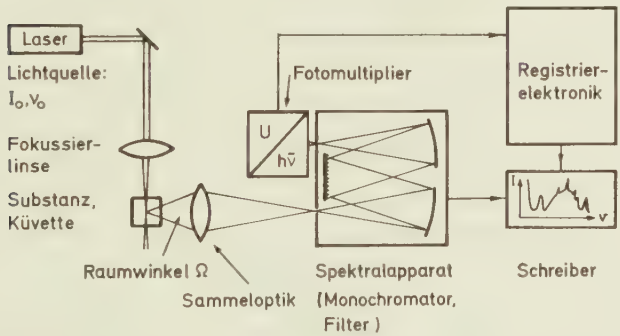


Abb. 2: Aufbau eines RAMAN-Spektrometers mit der Darstellung der wichtigsten Meßsystemkomponenten

Abb. 2 zeigt die typische Meßanordnung eines RAMAN-Spektrometers, bei der zur Streuanregung in die Substanzküvette fokussiertes Laserlicht eingestrahlt wird. Ein Teil des Streulichts wird unter 90° zur Einstrahlungsrichtung durch

die Sammeloptik im Raumwinkel Ω erfaßt und in einem Spektralapparat - Gitter- oder Prismenmonochromator, Interferenzfilter - mit einer spektralen Bandbreite s zerlegt. Die in elektrische Signale umgewandelten Lichtintensitäten werden als Funktion der RAMAN-Frequenz, d.h. der Frequenzverschiebung, registriert.

Zur Veranschaulichung der spektralen Eigenschaften bzw. der Struktur der RAMAN-Spektren von Substanzen in verschiedenen Aggregatzuständen zeigen die Abb. 3 und 4 typische Spektren. Die beiden Spektrentypen der RAMAN-Streuung in Gasen in Abb.3 unterscheiden sich vor allem durch die erforderliche spektrale

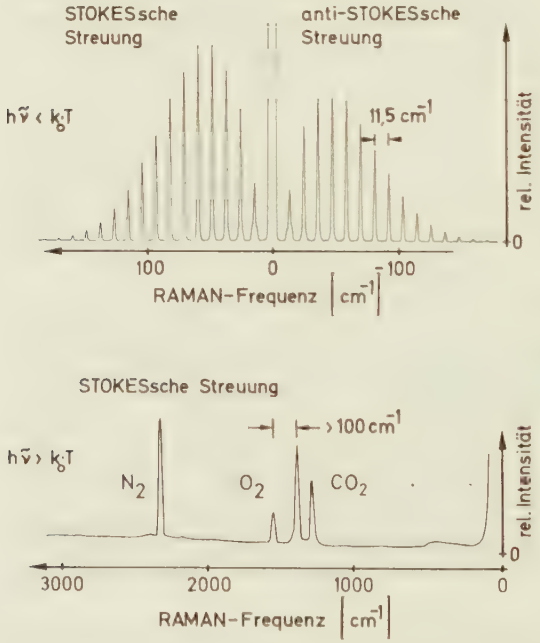


Abb. 3: Charakteristische Eigenschaften des Rotations-RAMAN-Spektrums ($h\tilde{\nu} < k_0T$) von reinem Sauerstoff und des Schwingungs-RAMAN-Spektrums ($h\tilde{\nu} > k_0T$) einer Luft-Kohlendioxid-Mischung

Bandbreite bei der Registrierung und den erfaßten Spektralbereich. Das Rotations-RAMAN-Spektrum von Sauerstoff (oben) zeigt eine Reihe nahezu äquidistanter Rotationslinien. Da die Energiequanten der Rotationsübergänge kleiner als die thermische Energie k_oT sind, für T = 300 K beträgt k_oT ca. 208 cm^{-1}, ergeben sich für entsprechende Rotationsübergänge STOKESsche und anti-STOKESsche Linienintensitäten der gleichen Größenordnung. Die Rotationsspektren der einfachen linearen Gasmoleküle, wie z.B. N_2O, CO_2, N_2 und O_2 bei der Analyse von Atem- und Narkosegasen, unterscheiden sich vor allem durch den Abstand der Rotationslinien, der ca. 2-12 cm^{-1} beträgt. Bei Gasmischungen kommt es zu Überlagerungen der einzelnen Linien, deren Auflösung zu meßtechnischen Schwierigkeiten führt. Bei den Schwingungsübergängen der einzelnen Gase in einer Mischung trennt die unterschiedliche Größe der Schwingungsenergieänderung die molekülspezifischen Rotationsschwingungslinien. Diese Struktur der einzelnen Schwingungsbanden ist in dem Spektrum einer Gasmischung, siehe Abb. 3 unten, durch die spektrale Bandbreite s = 30 cm^{-1} nicht aufgelöst. Für T = 300 K treten nur wenige intensive STOKESsche Linien mit einem Abstand von 100 - 1000 cm^{-1} zueinander auf.

Abb. 4 zeigt das RAMAN-Spektrum einer wässrigen Harnstofflösung (A) mit den einzelnen Schwingungslinien des Harnstoffs und dem Untergrund durch das Lösungsmittel. Im unteren Teil ist ein Resonanz-RAMAN-Spektrum (B) von Citratblut wiedergegeben. Dieses Spektrum setzt sich aus einzelnen Schwingungslinien und einem Störstrahlungsuntergrund zusammen, der durch die Fluoreszenz der Blutbestandteile und die RAMAN-Banden des Quarzfensters der Streuküvette bedingt ist. Während bei den Gasspektren der Untergrund durch Fluoreszenz im allgemeinen zu vernachlässigen ist, spielt er bei den Spektren in Abb. 4 eine entscheidende Rolle.

Das primäre Meßergebnis stellt die spektrale Verteilung der

Streuintensitäten, das RAMAN-Spektrum, dar, aus dem die Meßwerte zur Bestimmung der einzelnen Konzentrationen ermittelt werden müssen. Zur Identifizierung der einzelnen

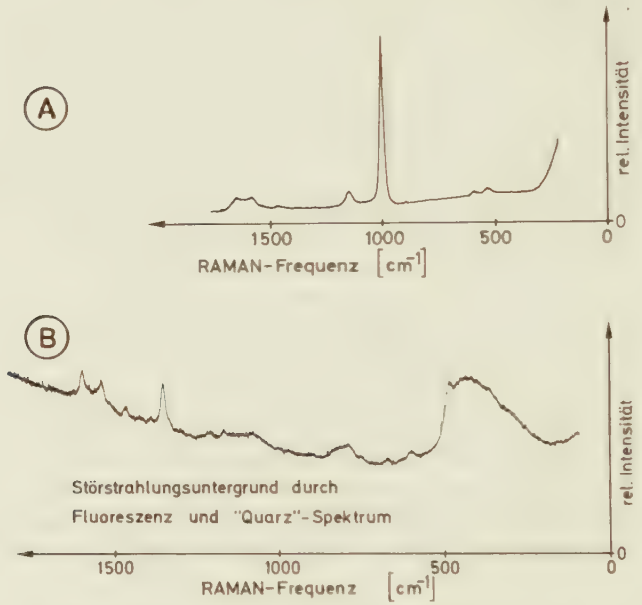


Abb. 4: RAMAN-Spektrum einer wassrigen Harnstofflösung (A) (1,7 Mol/l, λ_o = 647,1 nm) und Resonanz-RAMAN-Spektrum (B) von deoxygeniertem Citratblut (λ_o = 514,5 nm). Das Lösungsspektrum enthält als Störanteil das Spektrum von Wasser; im Spektrum des Citratbluts setzt sich der Untergrund aus der Fluoreszenzstrahlung der Blutbestandteile und dem RAMAN-Spektrum des Quarzfensters der Meßzelle zusammen.

Substanzen und zur Bestimmung ihrer Konzentrationen dienen die RAMAN-Frequenzen und Streuintensitäten bestimmter RAMAN-Linien. Hierbei ist die Streuintensität direkt proportional zur Molekülzahl N pro Volumen und damit zur Konzentration. Darüberhinaus dient der Depolarisationsgrad der Linien als weiteres Hilfsmittel für die Identifizierung. Die Form der

RAMAN-Linien wird bei den vorliegenden Untersuchungen nur bei der rechnerischen Kurvenanalyse zur Bestimmung der Intensität und des Depolarisationsgrades bzw. zur Reduzierung des "Rauschanteils" in den Resonanz-RAMAN-Spektren von Blut ausgenutzt.

Anhand der Abb. 5 sollen schematisch die charakteristischen Größen einer RAMAN-Linie erläutert werden. Die Registrierung der Streulichtintensität mit einer spektralen Bandbreite s klein gegenüber der Halbwertsbreite HWB der RAMAN-Linie ergibt den Verlauf der registrierten Intensität I(v). Die

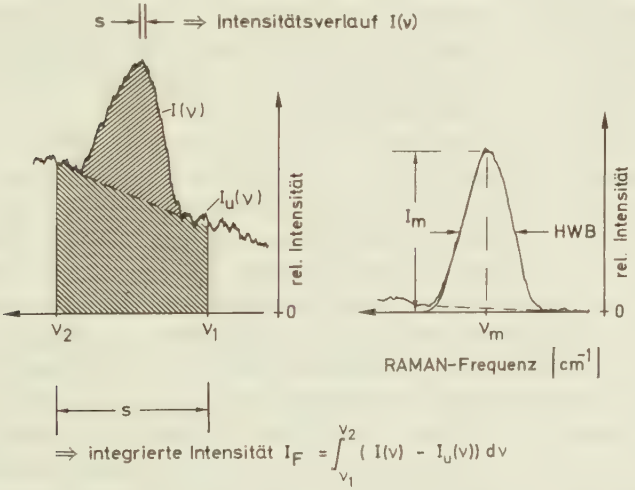


Abb. 5: Charakteristische Meßgrößen einer RAMAN-Linie, Zuordnung der Intensitätswerte der Linie und des Untergrundes; die Schraffur verdeutlicht die Größe der beiden Anteile der integrierten Intensität. Ober- und unterhalb der schraffierten Kurve sind die spektralen Bandbreiten s für die Registrierung des Intensitätsverlaufs (s<HWB, Einzelregistrierung) und für eine direkte Registrierung der integrierten Gesamtintensität (s>HWB, Mehrkanalregistrierung möglich) eingezeichnet.

Bestimmung der Maximalintensität I_m, der Halbwertsbreite HWB und der RAMAN-Frequenz ν_m (gleich Frequenz des Linienmaximums) erfordert die Abtrennung des Untergrundes. Der Verlauf von $I_u(\nu)$ im Bereich der RAMAN-Linie wird durch eine Gerade oder einen Polygonzug angenähert. Die eigentlich konzentrationsproportionale Größe ist die "integrierte Intensität" I_F, die entweder rechnerisch aus dem Kurvenverlauf nach der Abtrennung des Untergrundes ermittelt wird oder die sich bei bekanntem Untergrund direkt mit einer spektralen Bandbreite $s \approx \nu_1 - \nu_2$ messen läßt. Auf die integrierte Intensität I_F übt die "lichtverteilende Wirkung" des Spektralapparates im Gegensatz zur Maximalintensität keinen Einfluß aus. Die "lichtverteilende Wirkung" beschreibt die Veränderung der registrierten Linienform durch eine Änderung der spektralen Bandbreite oder eine spektrale Verschiebung des Transmissionsbereichs. Die Maximalintensität ist jedoch einfacher zu ermitteln und im Nichtresonanzfall bei konstanter spektraler Bandbreite proportional zur integrierten Intensität I_F.

Die Gesamtintensität I_R - aus I_m oder aus I_F gebildet - einer RAMAN-Linie* setzt sich aus zwei Streulichtkomponenten $I_\perp$ und $I_\parallel$ mit um 90° gegeneinander gedrehten Polarisationsrichtungen zusammen. Die Zuordnung dieser Streulichtkomponenten zur Polarisationsrichtung der Anregungsstrahlung, zur Streugeometrie und zu den molekülspezifischen Streueigenschaften - durch den RAMAN-Streutensor (α'_{ij}) ausgedrückt** - erfolgt bei der Diskussion der verschiedenen Streuanordnungen in Abschnitt 4. Der Quotient der beiden Streulichtkomponenten wird als Depolarisationsgrad ρ_s bezeichnet - $\rho_s = I_\parallel / I_\perp$ für linear polarisiertes Erregerlicht - und kennzeichnet die Anteile der isotropen und der anisotropen Streuung. In den verschiedenen Spektren treten

---

*nur bei nicht optisch aktiven Substanzen; die Messung mit zirkular polarisiertem Licht wird bei der Beschreibung der Anwendungsmöglichkeiten der Resonanz-RAMAN-Streuung diskutiert.

**RAMAN-Tensor (α'_{ij}) in üblicher Weise als "differentierter" Polarisierbarkeits-Tensor (α_{ij}) definiert; Differentiation der einzelnen Tensorkompotenten nach den Normalkoordinaten (vgl. (L9)). Für Gase und verdünnte Lösungen lassen sich nach PLACZEK (L8) die Tensorinvarianten $\bar{\alpha}'^2$ (Spur) und γ'^2 (Anisotropie) zur Beschreibung des Streuverhaltens verwenden.

drei Arten von RAMAN-Linien auf: polarisierte Linien (p) mit $0 \leq \rho_s < 3/4$, wie bei den Schwingungslinien von O_2 oder N_2, depolarisierte Linien (dp) mit $\rho_s = 3/4$, wie z.B. die Rotationslinien von O_2, sowie bei der Resonanz-RAMAN-Streuung zusätzliche, anomal polarisierte Linien (ap) mit $\rho_s > 3/4$, wie bei einigen Hämoglobinlinien. Die Kenntnis des Depolarisationsgrades einer Linie erleichtert bei der Analyse von Mischungen die Zuordnung der einzelnen RAMAN-Linien und ermöglicht bei der Resonanz-RAMAN-Streuung eine Aussage über das Resonanzverhalten der zugehörenden Molekülschwingung.

Die Messung der RAMAN-Frequenzwerte ist mit großer Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durchführbar. Die Eichung des Spektralapparates läßt sich auf einfache Weise mit den Linien einer Spektrallampe oder den Linien eines Ar^+- oder Kr^+-Lasers überprüfen. Die Messung der Streuintensitäten bereitet dagegen erhebliche Schwierigkeiten, die sowohl die Genauigkeit als auch die Reproduzierbarkeit betreffen. Nur unter Verwendung eines Eichstrahlers, dessen Intensität mit der RAMAN-Intensität in Form einer Differenzmessung direkt verglichen wird, lassen sich Intensitätswerte mit einer großen absoluten Genauigkeit ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dagegen die optische Nachweisempfindlichkeit E des RAMAN-Spektrometers mit der Strahlung einer Normallampe bestimmt. Die mit dieser Nachweisempfindlichkeit und unter Berücksichtigung der verschiedenen intensitätsschwächenden Parameter ermittelten Intensitätswerte besitzen eine geringere absolute Genauigkeit, die jedoch zur Bestimmung der Größenordnung des Feasibility Index ausreicht. Der Einfluß der verschiedenen intensitätsschwächenden Parameter, wie Temperaturdrift, Intensitätsschwankungen, mechanische Instabilitäten oder Verschmutzung der optischen Komponenten durch Staub, läßt sich durch die Verwendung relativer Intensitätswerte umgehen. In den vorliegenden Untersuchungen werden drei verschiedene Bezugswerte verwendet:

1. ein willkürlicher Intensitätswert im Spektrum, z.B. das Maximum der intensivsten RAMAN-Linie,
2. die Intensität einer Schwingungslinie einer Bezugssubstanz (interner Standard) in den untersuchten Proben, z.B. H_2O in verdünnten Lösungen, N_2 im Atemgas, SO_4^{2-} bei einigen Blutmessungen oder
3. ein externer Standard, wie Luft bei den Testgasmessungen, der alternierend mit den Substanzproben gemessen wird.

Eine von den Meßsystemparametern unabhängige Größe stellt der Streuquerschnitt σ dar. Die Richtungsabhängigkeit der RAMAN-Streuung wird durch die Angabe eines differentiellen Streuquerschnittes $d\sigma/d\Omega$ berücksichtigt. Bei kleinen Raumwinkeln ($\Omega \leq 1$) läßt sich als Näherung der Wert von $d\sigma/d\Omega$ für 90° (90°-Streugeometrie) im gesamten Raumwinkel Ω, in dem Streulicht erfaßt wird, verwenden (FENNER et al.(L 11)). Der Vergleich zwischen der berechneten Gesamtintensität I im Raumwinkel 4π für statistisch orientierte Moleküle (Gase) bei einem verlustfreien Meßsystem (L 8) und der registrierten Gesamtintensität I_R im Raumwinkel Ω zeigt, daß der differentielle Streuquerschnitt auch die Frequenzabhängigkeit enthält.

$$I = I_o \cdot \underbrace{((2^7 \cdot \pi^5)/(9 \cdot c_o^4)) \cdot (\tilde{\nu}_o - \tilde{\nu})^4 \sum_{ij} |\alpha_{ij}|^2 \cdot F_j}_{\text{Meßsystem}} \cdot (N V) \qquad (L8)$$

$$I_R = I_o \underbrace{(d\sigma/d\Omega) \cdot \Omega \cdot N \cdot L \cdot E}_{\text{Meßsystem}} \qquad (L11)$$

mit:

(α'_{ij}) = Elemente des RAMAN-Tensors, Dimension $[cm^2]$ - andere Dimension bei (L9) durch Einbeziehung der Molekülzahl -;

I_R und I_o = Intensität als Impulsrate $[Imp./s]$;

N = Zahl der Moleküle pro cm^3;

L = "Streulänge" (Streuvolumen V / Strahlquerschnitt);

E = Nachweisempfindlichkeit des Spektrometers.

Diese Definition des differentiellen Streuquerschnitts wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet, so wird in einigen Arbeiten die Temperaturabhängigkeit explizit angegeben, z.B. PENNEY et al. (L12) im Gegensatz zu FENNER et al. (L11). Diese Unterschiede sind bei der Verwendung von in der Literatur angegebenen Werten für die relativen und absoluten Streuquerschnitte zu beachten.

Das Beispiel der Registrierzeiten des Diäthylätherspektrums (L1) (siehe Einleitung) zeigte bereits eines der Probleme der Anwendbarkeit der RAMAN-Streuung als Analyseverfahren. Der Vergleich der Eigenschaften verschiedener Meßanordnungen läßt sich mit einer Größe, die den meßsystem- und den substanzspezifischen Einfluß, d.h. den "Gesamtwirkungsgrad" oder die "Anwendbarkeit" einer bestimmten Meßanordnung, beschreibt, durchführen. Auch bei der Anwendung der RAMAN-spektroskopischen Gasanalyse zur Fernmessung von Schadstoffen in der Luft (LIDAR), hat sich die Verwendung des "Feasibility Index X" (PENNEY, LAPP (L2)) als anschauliches Kriterium erwiesen. Für die klinisch-diagnostische Anwendung lassen sich die Geräteeigenschaften ebenfalls mit Hilfe dieses Feasibility Index beurteilen und optimieren. In der Größe X wird der differentielle Streuquerschnitt auf den Wert $d\sigma_L/d\Omega$ einer Streuanregung mit der Ar^+-Laserlinie bei $\sigma_L = 488$ nm bezogen. Der Frequenzeinfluß einer anderen Anregungswellenlänge λ_o läßt sich durch den Faktor q ausdrücken (ν_o = Laserfrequenz, ν_L = Laserbezugsfrequenz).

$$I_R = I_o \cdot N \cdot L \cdot E \cdot \Omega \cdot (d\sigma_L/d\Omega) \cdot \underbrace{\left(\frac{\nu_o - \nu}{\nu_L - \nu}\right)^4}_{q^{-4}}$$

$$\frac{I_R}{I_o} \cdot q^4 = X = N \cdot L \cdot E \cdot \Omega \cdot (d\sigma_L/d\Omega) \cdot M \cdot G$$

$$[cm^{-3}][cm][-][sr]\ [cm^2/sr]$$

Der dimensionslose X-Wert enthält den substanzspezifischen

Streuquerschnitt; der Einfluß der verschiedenen Meßsystemparameter ist multiplikativ.

Bezeichnet I_o die nominale Laserintensität, so erfaßt ein zusätzlicher Faktor M ("Multipass-Faktor") den Einfluß einer Intensitätssteigerung durch eine spezielle Streuanordnung oder eine Streuung im Laserresonator ("intra cavity"-Streuung). Der Multipassfaktor M setzt sich ebenfalls multiplikativ aus den verschiedenen optischen Transmissionsgraden und den Steigerungsfaktoren der Komponenten der Streuanordnung zusammen. Ein "Flächenfaktor" G - entspricht F_c bei FENNER et al. (L11) - berücksichtigt bei der Registrierung der Rotations-RAMAN-Spektren die optische Fehlanpassung der Streuanordnung an den Spektralapparat. Damit gibt die Größe X den spezifischen Bruchteil der eingestrahlten Intensität an, der als Meßsignal zur Verfügung steht; zur Vereinfachung werden die Intensitätswerte als Impulsrate $\left[\text{Photonen}/\text{s}\right]$ bzw. $\left[\text{Imp.}/\text{s}\right]$ angegeben.

Der Feasibility Index einer bestimmten Meßanordnung und einer Substanz ermöglicht die Diskussion der Anwendungsmöglichkeit, wobei entweder die Frage der minimalen, noch nachweisbaren Konzentrationen N_{min} für eine bestimmte Laserintensität I_o oder die Frage der notwendigen minimalen Anregungsintensität $I_{o_{min}}$ bei einer gegebenen Konzentration geklärt werden kann. Beide Fragen spielen bei klinisch-diagnostischen Anwendungen eine Rolle, da sie die Nachweisgrenze einer bestimmten Substanz in einer Mischung bzw. den erforderlichen technischen Aufwand für eine bestimmte Anwendung kennzeichnen. Darüberhinaus bietet die in dieser Arbeit verwendete Beschreibung der Meßsignale als Impulsraten und des Einflusses der einzelnen Meßsystemparameter als Feasibility Index die Möglichkeit, aus der gemessenen Gesamtintensität, die sich aus der RAMAN-Intensität und dem Untergrund zusammensetzt, und der diagnostisch zulässigen Meßzeit die Meßgenauigkeit für eine bestimmte Anwendung abzuschätzen.

3.2 Klinische Anwendungsbereiche und Vergleichsverfahren

Grundsätzlich läßt sich die RAMAN-Spektroskopie als klinisches Analyseverfahren in allen Fällen anwenden, in denen direkt oder indirekt Konzentrationswerte von Substanzen bestimmt werden. Hierbei sind Stoffwechselprodukte, Medikamente oder Narkosemittel von besonderem Interesse. Hinzu kommt die Bestimmung von Konzentrationsänderungen, wie z.B. die der Substrate bei der Aktivitätsbestimmung von Enzymen. Einatomige Substanzen, wie Edelgase oder Ionen, lassen sich allerdings wegen des Fehlens anregbarer Molekülschwingungen RAMAN-spektroskopisch nicht nachweisen.

Die Bestimmung der einzelnen Stoffwechselparameter erfolgt heute mit einer Vielzahl verschiedener klinisch-chemischer Testverfahren unterschiedlicher Spezifität und Genauigkeit. Während die analytische Genauigkeit weitgehend den Anforderungen entspricht, bereitet die diagnostische Interpretation Schwierigkeiten, so daß zur Überwindung andere Lösungswege bei der Weiterentwicklung der klinischen Analysen verfolgt werden (KELLER (L63)). Hierbei gewinnen Verfahren zur kontinuierlichen Messung mit hoher zeitlicher Auflösung besondere Bedeutung, da sie insbesondere in der Intensivpflege eine schnelle Therapieentscheidung ermöglichen. Auch in der Präventivmedizin dürften damit wesentliche Voraussetzungen für die Erfassung breiter Bevölkerungsschichten bei der Früherkennung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen geschaffen werden. Die kontinuierliche Messung der Atemgase, des Hämoglobins und der Glucose sind dabei diagnostisch besonders wichtig.

Bei der technischen Weiterentwicklung der diskontinuierlichen Laboruntersuchungen strebt man eine Erhöhung der Analyseleistung an, die sich durch eine Verkürzung der Analysenzeit (Automatisierung der Messung, Mechanisierung der Probenaufbereitung), durch die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Parameter und durch eine automatische Steuerung der benötigten

Testkombinationen erreichen läßt. Bei den kontinuierlichen Messungen besteht das Ziel in einer Erweiterung der Zahl der erfaßbaren Substanzen, in der Verlängerung der störungsfreien Einsatzzeit durch eine Driftkompensation und in der Verringerung des technischen Aufwandes, um einen breiten klinischen Einsatz zu ermöglichen.

Im Rahmen dieses Entwicklungstrends in der klinischen Analysentechnik sind die hier vorliegenden Untersuchungen als Versuch zu sehen, die verschiedenen, bereits erwähnten Vorteile der RAMAN-Spektroskopie für eine klinische Anwendung zu nutzen. Dabei stehen die oben genannten Forderungen eines klinischen Einsatzes für eine kontinuierliche in vivo Analyse mehrerer Stoffwechselprodukte in ihrer natürlichen Zusammensetzung im Vordergrund. Die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der flüssigen und der gasförmigen Substanzmischungen führen zu getrennten Untersuchungen, wobei die auftretende Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung gesondert behandelt wird. Grundsätzlich verteilt sich diese Anwendung des RAMAN-Effektes auf drei Bereiche:

1. natürliche Körperflüssigkeiten
2. Blut
3. Gase

Bei den klinischen Anwendungen sind in vitro und in vivo Untersuchungen zu unterscheiden. Im Gegensatz zum Gebrauch des Begriffs "in vivo" in der RAMAN-spektroskopischen Literatur über die Untersuchungen biologischer Substanzen wird in dieser Arbeit der Begriff nur für direkte Untersuchungen am Patienten verwendet. Beispiele für derartige Untersuchungen stellen die kontinuierliche Entnahme geringer Substanzmengen, wie bei der kontinuierlichen Glucosemessung mit einer extrakorporalen Heparinisierung durch SAILER et al. (L13) oder bei Gasanalysen, dar.
Bei anderen Verfahren erfolgt die Analyse im Bypass, z.B. bei Blutgasanalysen im extrakorporalen Kreislauf (vgl. ADAMS et al.

(L14)). Darüberhinaus sind einige Verfahren zur in vivo Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks und der Sauerstoffsättigung in klinischer Anwendung bzw. zum kontinuierlichen Nachweis von Glucose und Lactat mit Hilfe elektro-chemischer Sensoren mit immobilisierten Enzymen (vgl. MINDT et al. (L16)) in der Erprobung.

Laboruntersuchungen an entnommenen Proben gehören zu den in vitro Analysen, bei denen eine Vorbehandlung der Substanzen zur Abtrennung störender Bestandteile möglich ist und die Analyse in einem beliebigen zeitlichen Abstand zur Entnahme stattfindet. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden - mit Ausnahme der Atemgasmessungen - als in vitro Analysen durchgeführt, da sich die Mehrzahl der Fragen hinsichtlich einer in vivo Anwendung der RAMAN-Spektroskopie an entnommenen Proben, an Lösungen der Reinsubstanzen und an Testmischungen klären läßt.

Zum Verständnis der Aufgabenstellung werden kurz die Stoffwechselprodukte in den Körperflüssigkeiten beschrieben. Die größte Bedeutung besitzen klinisch-chemische Analysen von Stoffwechselprodukten für die Diagnose und Überwachung von Herz-, Leber- und Nieren-Erkrankungen, hinzu kommen verschiedene Stoffwechselanomalien. Für einen Überblick über die Eigenschaften und die Funktion der einzelnen Stoffwechselparameter wird auf die biochemische und die pathophysiologische Literatur verwiesen. In Tab. 1 sind als Beispiel für die Intensivpflege die wichtigsten Substanzen bzw. Laboruntersuchungen zusammengestellt. Sieht man von den Blutgaspartialdruckwerten pO_2 und pCO_2 und der Sauerstoffsättigung $S(O_2)$ ab, so enthält die linke Spalte die Substanzen, die sich durch die RAMAN-Spektroskopie grundsätzlich erfassen lassen. Die Normalwerte der Konzentrationen beziehen sich meist auf das Serum und nicht auf Vollblut, daneben vermeidet die Abtrennung der Erythrozyten bei diesen Untersuchungen

weitgehend das Auftreten der Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung.

Für RAMAN-spektroskopische Analysen eignen sich auch die Produkte des Energiestoffwechsels, wie Lactat, Pyruvat, Glucose, Adenosinphosphate (ADP, ATP) im Serum, sowie verschiedene Substanzen in Blutserum und Harn, wie Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Aminosäuren, Proteine, Nucleotide und bestimmte Enzyme bzw. Coenzyme. Einzelheiten werden in Abschnitt 5.1 diskutiert; einen Überblick über die in der

RAMAN-spektroskopische Analyse

prinzipiell möglich:	nicht möglich:
pO_2, pCO_2	HCO_3^-
$S(O_2)$	Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-
Hämoglobin	Leukozyten
Glucose	Thrombozyten
Harnstoff	Gesamtprotein
Kreatinin	Blutgruppe
Bilirubin	Enzyme
Lactat, Pyruvat	
CO-Hämoglobin	
Barbiturate	
Enzyme	

Tab. 1: Zusammenstellung verschiedener Laboruntersuchungen für die Intensivpflege mit der Trennung nach prinzipiell RAMAN-spektroskopisch nachweisbaren und nicht nachweisbaren Substanzen

Literatur vorliegenden RAMAN-spektroskopischen Strukturuntersuchungen biochemischer Substanzen vermitteln die bereits zitierten Arbeiten (L3)-(L5) und KOENIG (L15).

Obwohl die Messung an Blutserum bereits eine Verbesserung

klinisch-chemischer Analyseverfahren bietet, erfordert eine in vivo Anwendung die Messung an Vollblut. Hierbei lassen sich zusätzlich zu den erwähnten Substanzen die Blutgaspartialdrucke bestimmen. Die Bestimmung der Sauerstoffsättigung ist darüberhinaus durch die reversible Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin in den Erythrozyten grundsätzlich nur in Vollblut möglich. RAMAN-spektroskopisch kann der Nachweis der Partialdrucke wie bei der massenspektrometrischen Methode (z.B. WALD (L17)) mit einem Gastransportkatheter in der Gasphase erfolgen. Für die direkte Bestimmung der Sauerstoffsättigung bietet sich die Resonanz-RAMAN-Streuung an. Bisher liegen nur Untersuchungen zur Aufklärung des Vorgangs der reversiblen Sauerstoffbindung der Hämgruppe an verdünnten, reinen Hämoglobinlösungen vor, (L2)-(L6) und SPIRO (L18).

Der Vorteil des hier diskutierten Verfahrens liegt darin, daß die Sauerstoffsättigung direkt aus den Konzentrationen des oxygenierten Hämoglobins und des gesamten Hämoglobins bestimmt wird und nicht auf einer Berechnung aus den O_2-Partialdruckwerten mit Hilfe einer standardisierten O_2-Bindungskurve des Hämoglobins beruht. Der diagnostische Wert der indirekten Methode ist gerade bei kritischen Krankheitszuständen in der Intensivpflege eingeschränkt, da sich die O_2-Bindungskurve durch Temperatur- und pH-Wert-Änderungen sowie unter dem Einfluß von Medikamenten und Narkosemitteln verschieben kann. Die Sauerstoffsättigung bezeichnet den Anteil des Oxyhämoglobins (OxyHb) an der Gesamthämoglobinkonzentration im Blut und entspricht der O_2-Bindungskapazität; der Maximalwert von 100% wird in normalem Blut bei einer O_2-Konzentration von ca. 20 Vol.% erreicht. Vergleichsverfahren stellen oximetrische Messungen dar, bei denen die spektralen Absorptions- und Reflexionsunterschiede von Hämoglobin (Hb) und Oxyhämoglobin ausgenutzt werden.

Ein entsprechender direkter Nachweis der CO_2-Konzentration

im Blut ist nicht möglich, da das CO_2 nicht im Bereich der chromophoren Hämgruppe, sondern überwiegend an den Seitenketten gebunden oder im Plasma gelöst wird. Neben dem massenspektrometrischen Analyseverfahren finden zur Bestimmung des O_2-Partialdrucks im Blut membranbedeckte elektrochemische Sensoren, Gaselektroden, KESSLER et al. (L19), Anwendung. Im Langzeiteinsatz treten bei diesen membranbedeckten Elektroden Schwierigkeiten auf, die von einer Ablagerung von Blutbestandteilen auf der Membran, von einer Veränderung der Nachweisempfindlichkeit und vom Störeinfluß bestimmter Narkosemittel im Blut verursacht werden.

Neben Hämoglobin enthält das Blut weitere chromophore Substanzen, wie die Hämoglobinabbauprodukte Bilirubin oder Biliverdin, die chromophoren Enzyme, wie z. B. Transferrin, Flavine, oder Vitamine, z.B. B_{12} (Cobalamin), in unterschiedlicher Konzentration. Für die RAMAN-spektroskopische Sauerstoffsättigungsbestimmung ist deshalb die eindeutige Zuordnung der resonanzverstärkten Schwingungslinien der einzelnen Substanzen zu klären.

Die O_2-Aufnahme und die CO_2-Abgabe stellen Bilanzgrößen des gesamten Gas- und Energiestoffwechsels dar und eignen sich deshalb besonders für eine Intensivüberwachung. Der Gasaustausch der äußeren Atmung zwischen dem Blut als Transportmedium und der Umgebung findet in den Alveolen der Lunge statt. Verschiedene Methoden der Blutgasanalysen wurden bereits erwähnt; Atemgasanalysen können entweder mit einem Katheter zur Bestimmung der räumlichen Konzentrationsverteilung direkt in der Lunge oder in der Atemluft durchgeführt werden. Durch die Vermischung der Ausatemluft mit der nicht am Gasaustausch beteiligten Totraumluft in den Atemwegen entspricht die Zusammensetzung der Atemluft nur in der letzten Phase der Ausatmung der der Alveolarluft.

Die Überwachung der O_2-Aufnahme und der CO_2-Abgabe läßt sich in der Atemluft durchführen; oft ist es notwendig, zusätzlich zu den Atemgasmessungen die Blutgase zu analysieren. Der diagnostische Wert dieser Messungen liegt in der Registrierung des zeitlichen Verlaufs der Konzentrationen im Atemgas, in der Bestimmung der Mittelwerte in der Alveolarluft, im arteriellen und im venösen Blut sowie in der Bestimmung verschiedener Differenzwerte - alveolär-arteriell oder arteriell-venös - der O_2 und CO_2-Konzentrationen (vgl. PIIPER (L20)).
Zu den atemphysiologischen Untersuchungen und der Bestimmung kardiovaskulärer Parameter, wie "Herzzeitvolumen" und O_2-Ausnutzung, kommt die Überwachung der in- und exspiratorischen Narkosegase. Typische Narkosegasmischungen bestehen aus N_2O und O_2 mit Narkosemitteln wie Halothan oder Ethran.

Die meßtechnische Aufgabe besteht im Nachweis von O_2, N_2, CO_2, H_2O-Dampf, N_2O, CO und Narkosemitteldämpfen. Zu bestimmen ist die intensitätsproportionale Konzentration als Molekülzahl pro Volumen bzw. als "fraktionelle" Konzentration unabhängig von den verschiedenen Volumen-Meßbedingungen (vgl. PIIPER(L20)).
Der Feasibility Index X bezieht sich bei der Gasmeßapparatur auf eine Konzentration von 100 Vol.% Gas, z.B. N_2, bei 1,013 bar und 300 K.
Ein für die klinische Anwendung geeignetes Meßgerät muß die folgenden Anforderungen erfüllen:

1. Nachweis der oben genannten Gase
2. Simultanregistrierung mehrerer Komponenten
3. Driftkompensation durch eine Normierung der Meßsignale

Bei Atemgasanalysen läßt sich die bei Luftatmung konstante N_2-Menge zur Normierung verwenden. Die ein- und ausgeatmeten Volumina sind durch die Unterschiede zwischen der O_2-Aufnahme und der CO_2-Abgabe und durch den exspiratorischen Wasserdampf verschieden; der respiratorische Quotient, CO_2-Abgabe/O_2-Aufnahme, beträgt in Ruhe ca. 0,8.

Für klinische Gasanalysen wurden bereits eine Reihe von Meßverfahren bei Ausnutzung verschiedener physikalischer und chemischer Effekte (siehe Tab. 2) vorgeschlagen, die zum Teil angewandt werden. Die Bestimmung der Atemgaspartialdrucke erfolgt polarografisch oder massenspektrometrisch.

Für die Diskussion der eigenen Untersuchungen dient die massenspektrometrische Methode als Vergleichsverfahren; als Kriterien gelten:
Parallelregistrierung mehrerer Komponenten
Ansprechzeit $\leq$ 0,1 s
Meßgenauigkeit und Driftkompensation

MESSPRINZIP	GASE	KENNZEICHEN	AUTOR
manometrisch (VAN SLYKE) oder volumetrisch (SCHOLANDER) (chem.Absorption)	Atem-, Blutgase O_2, CO_2	klassische Methode	(L20)
polarografisch, O_2-, CO_2- Elektroden	Atem-, Blutgase	Einzelmessung, Drift	(L18), (L21)
IR - Absorption	CO_2	Einzelmessung	(L14)
Gasentladung	O_2, CO_2	Doppelmeßsystem	(L19)
paramagnetisch	O_2	Einzelmessung	(L21)
akustisch (Schallgeschwindigkeit)	Narkosegase N_2O, O_2	Doppelmeßsystem	(L21)
UV- Absorption	Halothan	Einzelmessung	(L21)
Oximeter (opt. Absorption oder Reflexion)	Blut Hb, OxyHb	Störung durch Blutbestandteile	(L22)
Gas- Chromatografie (Adsorption)	mehrere Gase	große Ansprechzeit	(L14), (L21)
Massenspektrometrie	mehrere Gase	genau, großer technischer Aufwand	(L14), (L17), (L23)

Tab. 2: Zusammenstellung verschiedener Meßverfahren für klinische Gaspartialdruckbestimmungen mit der Angabe typischer Kennzeichen und dem Hinweis auf einige Beschreibungen in der Literatur

Bei den Untersuchungen zur RAMAN-spektroskopischen Gasanalyse stehen deshalb neben der Meßgenauigkeit und zeitlichen Auflösung die Möglichkeit einer Driftkompensation für einen Langzeiteinsatz und eine Verringerung des technischen Aufwandes für einen breiten klinischen Einsatz im Vordergrund.

3.3 Problemstellung

Nach der Beschreibung der RAMAN-Streuung und ihrer Einsatzmöglichkeit in der klinischen Diagnostik ergeben sich die folgenden Einzelaufgaben.

RAMAN-Streuung in den natürlichen Körperflüssigkeiten

Die Untersuchung erfolgt in zwei Schritten, um die Nachweisgrenze der Stoffwechselprodukte in wässriger Lösung und die Streueigenschaften natürlicher Körperflüssigkeiten getrennt zu bestimmen.
Die Identifizierung der einzelnen Stoffwechselprodukte und die Bestimmung der Nachweisgrenze anhand konzentrierter wässriger Lösungen wird mit einem empfindlichen kommerziellen RAMAN-Spektrometer* CARY 82 der Fa. Varian durchgeführt. Dazu gehören der Vergleich mit den Angaben in der Literatur, die Bestimmung des Feasibility Index bzw. der Nachweisempfindlichkeit und die Diskussion der Steigerungsmöglichkeiten durch die Konzeption eines Meßgerätes.
Die natürlichen Körperflüssigkeiten stellen Mischungen komplexer Zusammensetzung dar, die durch das Auftreten von Fluoreszenz bei der Lichtstreuung und große Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Komponenten gekennzeichnet sind. Untersucht wird die RAMAN-Streuung an Blut-, Blutserum- und Harnproben; außerdem wird der spektrale Verlauf der Fluoreszenzintensität bestimmt. Zusätzlich werden einige Möglichkeiten zur Substanztrennung vor der Streuung oder zur Abtrennung des Streulichts von der Fluoreszenzstrahlung diskutiert.

---

*RAMAN-Spektrometer des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, das für diese Untersuchungen benutzt werden konnte. Die Blutkonserven (Citratblut) und die Blutserumproben stellten die Blutbank der Chirurgischen Klinik und die Narkosegase das Institut für Anästhesiologie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung.

Resonanz-RAMAN-Streuung in Blut

Das Streuspektrum von Blut weist einen intensiven Fluoreszenzstrahlungsuntergrund auf; hinzu kommt der Störeinfluß der zellulären Blutbestandteile auf die Lichtstreuung. Untersucht werden Citratblutproben in ihrer natürlichen Zusammensetzung. Die Untersuchungen setzen sich aus der Bestimmung der Meßparameter der Fluoreszenzstrahlung, dem Bau einer Meßanordnung mit einem künstlichen Blutkreislauf, der Registrierung von Spektren in den drei Resonanzbereichen, der Identifizierung der RAMAN-Linien und der Bestimmung der Sauerstoffsättigung zusammen.

In Hinblick auf die in der Literatur vorliegenden Spektren reiner Hämoglobinlösungen werden die Unterschiede im Streuverhalten von Vollblut ermittelt. Die Anwendung der RAMAN-Streuung zur Sauerstoffsättigungsbestimmung erfordert zusätzlich die Bestimmung des Einflusses der Anregungswellenlänge auf das Störsignal-Nutzsignal-Verhältnis, auf eine eventuelle Blutschädigung und auf die Photodissoziation des Oxyhämoglobins. Die Sauerstoffsättigung wird aus den Spektren verschiedener Resonanzbereiche ermittelt, der zeitliche Verlauf der Konzentrationsänderungen während einer Oxygenation erfaßt und der Feasibility Index bestimmt.

RAMAN-spektroskopische Gasanalysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich vor allem mit dem Vergleich der Analysen mit Hilfe der beiden Typen von Gasspektren (vgl. Abb. 3) und dem jeweils notwendigen technischen Aufwand.
Die Schwerpunkte der Untersuchungen bestehen aus der Registrierung der Spektren der reinen Gase unter vergleichbaren Bedingungen, der Trennung von Mischungen, der Bestimmung der Streuquerschnitte und ihrem Vergleich mit den in der Literatur be-

kannten Werten, der Bestimmung des Feasibility Index sowie der Diskussion anderer Verfahren zur spektralen Zerlegung des Streulichts für eine Optimierung des Meßverfahrens. Diese Untersuchungen werden durch die Analyse typischer Narkosegasmischungen ergänzt.

Die Diskussion der Optimierungsmöglichkeiten für die Ausnutzung der Rotationsspektren läßt sich mit Hilfe der Angaben in der Literatur führen; dagegen wurde für die Simultanregistrierung der Schwingungslinien ein einfacher und lichtstarker Spektralapparat entwickelt, sowie mit einer einfachen Meßanordnung der zeitliche Verlauf der Atemgaskonzentrationen registriert.
Der Konzeption eines Meßgerätes für eine klinische Anwendung liegen die Diskussion der Werte des Feasibility Index der verschiedenen Meßanordnungen und die in Abschnitt 3.2 aufgestellten Anforderungen zugrunde.

4. VERSUCHSAUFBAU, EXPERIMENTELLE ENTWICKLUNGEN, AUSWERTEVERFAHREN

Experimentelle Schwerpunkte sind die Entwicklung einer digitalen Spektrometerelektronik, die Erweiterung des Spektrometers CARY 82 durch spezielle Streuanordnungen und eine digitale Speicherelektronik, die Entwicklung eines Programms zur rechnerischen Kurvenanalyse, der Bau eines Interferenzfilterpolychromators zur Parallelregistrierung und der Aufbau eines vereinfachten Gasmeßsystems zur Einzelregistrierung des zeitlichen Verlaufs der Atemgaskonzentrationen.

4.1 Aufbau eines RAMAN-Spektrometers

Der prinzipielle Aufbau eines RAMAN-Spektrometers wurde bereits anhand der Abb. 2 beschrieben. Für eine Reihe von Untersuchungen wurde aus einem Kr^+-Laser mit Polarisationsdreher, Umlenkprisma und Fokussierlinse zur Streuanregung, einem Objektiv zur Streulichterfassung, einem Prismenmonochromator zur Streulichtzerlegung und einer digitalen Steuer- und Registrierelektronik ein RAMAN-Spektrometer aufgebaut. Der verwendete Prismenmonochromator besitzt für die mit der Laserlinie λ_o = 647,1 nm angeregten Spektren nur eine geringe spektrale Auflösung; die förderliche Spaltbreite beträgt ca. 30 cm^{-1} und die Streulichtunterdrückung ca. 10^{-4} im Abstand von 1000 cm^{-1} von der Laserlinie. Diese Meßanordnung ist nur für eine Registrierung der RAMAN-Spektren reiner Substanzen, wie Milchsäure oder Äthanol, und hochkonzentrierter, wässriger Lösungen geeignet.

Bei der Entwicklung der Steuerelektronik, den schematischen Aufbau zeigt Abb. 6, wurde deshalb eine Austauschmöglichkeit des Spektralapparates vorgesehen. Die Aufteilung des Registrierbereichs der Spektren in 1000 Meßpunkte oder "Kanäle",

unabhängig vom Typ und von der Dispersionskurve des Spektralapparates, ergibt für die Ansteuerung des Schrittmotors einen linearen Zusammenhang zwischen der Schrittzahl und der Drehwinkeländerung. Anfangs- und Endwert des Meßbereichs sind digital vorwählbar; damit lassen sich Teilspektren reproduzierbar wiederholen. Die Steuerelektronik besteht aus einem Vorwärts-Rückwärts-Zähler und zwei Komparatoren zum Vergleich der aktuellen Kanalzahl mit den vorgewählten Grenzwerten.

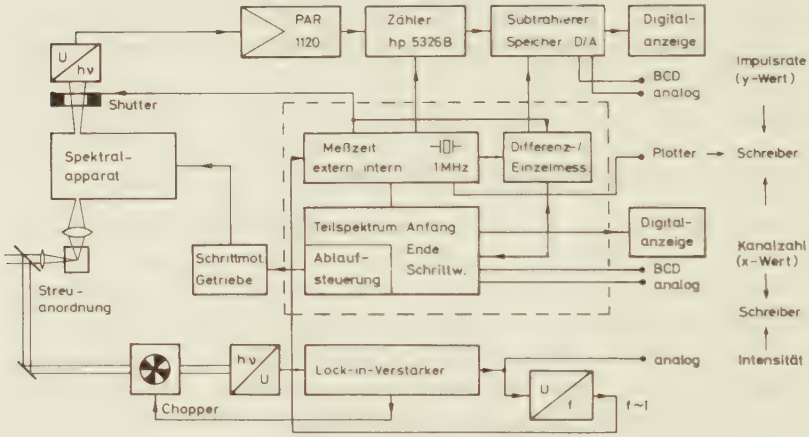


Abb. 6: Blockdiagramm der Steuer- und Meßelektronik des RAMAN-Spektrometers für Differenzmessungen. Die Elektronik setzt sich aus einer zentralen Steuereinheit, zwei Meßzweigen - photon counting und Lock-in-Verstärker - und Peripheriegeräten zusammen. Dargestellt ist die Schaltung zur Kompensation von Intensitätsschwankungen der Laserstrahlung mit Hilfe einer intensitätsproportionalen, externen Frequenz f zur Bestimmung des Meßzeitintervalls.

Zur Verschiebung des spektralen Transmissionsbereichs löst jeder Steuerimpuls vor einem neuen Meßzyklus eine vorgewählte Anzahl von Schrittimpulsen aus. Zum Antrieb mechanisch

durchstimmbarer Spektralapparate dient ein Schrittmotor mit einem Getriebe, Untersetzung 10:1, effektiver Drehwinkel $0{,}09^{\circ}$ pro Schrittimpuls. Zusätzlich wird die aktuelle Kanalzahl, der Inhalt des Zählers, durch einen Digital-Analog-Wandler (D/A) für die Registrierung der Spektren oder die Ansteuerung eines spannungsgesteuerten Spektralapparates als analoges Signal ausgegeben.
Das Meßsystem zur Registrierung der Streuintensität besteht aus zwei Meßzweigen, einer Registriereinheit zur Differenzphotonenzählung und einem "Lock-in-Verstärker" mit einem Chopper zur Erfassung modulierter Lichtsignale. Aufgezeichnet werden die Spektren mit einem x-y-Schreiber. Die beiden Meßzweige lassen sich alternativ oder kombiniert einsetzen.

Bei der Messung von Lichtintensitäten mit dem "photon-counting"-Meßzweig lassen sich verschiedene Störeinflüsse kompensieren. Es handelt sich dabei um die Dunkelimpulsrate des Fotomultipliers und um die Schwankungen der Laserintensität. Zur Subtraktion der Dunkelimpulszahl N_D von der Gesamtzahl der registrierten Impulse N_H dienen alternierende "Hell-Dunkel"-Messungen durch Öffnen und Schließen des Shutters sowie die digitale Subtraktion der beiden Zahlen. Die Kompensation von Intensitätsschwankungen läßt sich über eine intensitätsabhängige Länge des Torzeitintervalls des Zählers der photon-counting Einheit erreichen. Das intensitätsproportionale Bezugssignal wird, wie in Abb. 6 dargestellt, mit Hilfe des Lock-in-Verstärker-Meßzweigs und eines spannungsgesteuerten Oszillators in Form einer "externen" Frequenz f erzeugt. Diese Frequenz bestimmt an Stelle der "intern" erzeugten 10 kHz-Frequenz die Länge des Torzeitintervalls.

Zur Veranschaulichung des zeitlichen Ablaufs der verschiedenen Steuersignale für die Erfassung des Differenzwertes und die Steuerung des Spektralapparates dient das Impulsdiagramm in Abb. 7 rechts.

Ein Meßzyklus umfaßt die Steuerimpulse zum Öffnen und Schließen des Fotoverschlusses (Shutter) sowie die Taktimpulse zur Registrierung und Zwischenspeicherung der Impulszahl für geöffneten (Hellwert) und geschlossenen (Dunkelwert) Shutter sowie zur Subtraktion und Speicherung der Differenz im Ausgangsspeicher. Bei Einzelmessung, d.h. ohne Subtraktion der Dunkelimpulszahl, entfallen die Impulse zur Steuerung des Fotoverschlusses, der zweite Torzeitimpuls und der Impuls "Takt 1". Die Meßzeit läßt sich bei einer Verwendung der internen 10 kHz-Frequenz zwischen 0,1 s und 1000 s einstellen.

Der Aufbau der Subtrahier- und Speichereinheit ist für eine Dezimalstelle in Abb. 7 links schematisch dargestellt. Zur technischen Vereinfachung des Spektrometeraufbaus wurde im

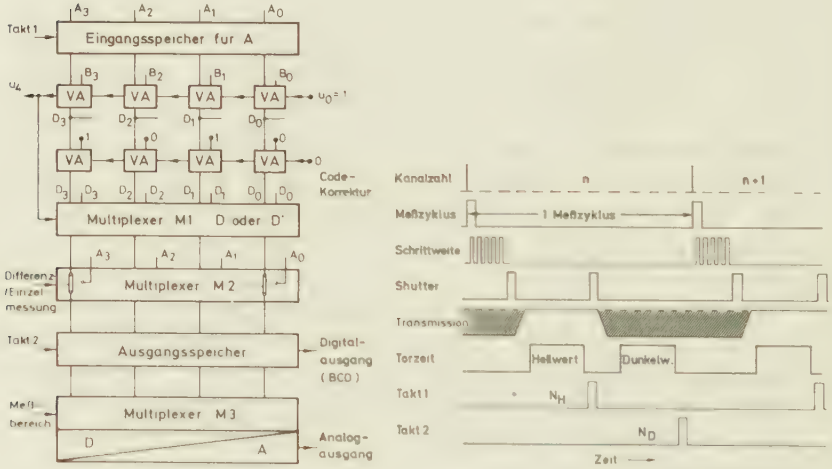


Abb. 7: Blockschaltbild der Subtrahier- und Speichereinheit (eine Dezimalstelle) und Impulsdiagramm für einen Meßzyklus; bei Einzelmessungen (keine Differenz, kein Dunkelwert) entfallen die Impulse zum Öffnen und Schließen des Shutters und die Impulse "Takt 1".

photon-counting-Meßzweig ein 50MHz-Zähler eingesetzt, dessen Zählerinhalt als 8-stellige BCD-codierte Dezimalzahl parallel ausgegeben wird. Für eine Reduzierung des technischen Aufwandes werden die Meßwerte parallel weiterverarbeitet; in diesem Fall läßt sich die Subtraktion mit Hilfe von Volladdierern (VA) durchführen. Dabei werden die Binärstellen (B_o, B_1, B_2, B_3) der zu subtrahierenden Zahl B invertiert zu den Binärstellen (A_o, A_1, A_2, A_3) der Zahl A addiert. Der Übertrag der niedrigsten Stelle wird fest vorgegeben ($\ddot{u}_o = 1$) und der Übertrag der höchsten Stelle invertiert. Da jedoch BCD-codierte Dezimalzahlen nur 10 der 16 möglichen Binärzahlen mit 4 Binärstellen ausschöpfen, treten bei der Subtraktion von BCD-Zahlen für den Fall B > A Fehler auf. In diesem Fall erfordert die Korrektur dieses Fehlers die zusätzliche Addition der Zahl 10 oder die Subtraktion der Zahl 6.

Der Aufbau des Subtrahierers erfolgte mit 4 Bit-Binäraddierern in TTL-Logik (entsprechend den Bauelementen der Steuerelektronik), so daß das Auftreten eines "negativen" Übertrages $\ddot{u}_4$ das Umschaltsignal des Multiplexers M_1 von den direkten Differenzwerten (D_o, D_1, D_2, D_3) auf die Code-korrigierten Werte (D'_o, D'_1, D'_2, D'_3) liefert. Der Multiplexer M_2 verbindet je nach gewähltem Meßprogramm den Ausgangsspeicher bei Einzelmessungen direkt mit dem Dateneingang zur Speicherung der Zahl A oder bei den Differenzmessungen mit dem Ausgang des Multiplexers M_1 zur Speicherung der berichtigten Differenzwerte. Der Inhalt des Ausgangsspeichers steht am Digitalausgang als 8-stellige BCD-codierte Dezimalzahl für die rechnerische Auswertung zur Verfügung. Für die Analogregistrierung von Spektren mit einem x-y-Schreiber ermöglicht der Multiplexer M_3 die Auswahl von 3 Dezimalstellen.

Das hier gewählte Verfahren der Differenzbildung zur Unterdrückung der Dunkelimpulse des Fotomultipliers (RCA C31034) läßt sich auch für andere Differenzmessungen, wie z.B. zur

Unterdrückung des Lösungsmittelspektrums, einsetzen. Die hohe Dunkelimpulsrate der "rotempfindlichen" GaAs-Fotokathode von ca. $2 \cdot 10^4$ Imp./s bei 293 K wird dafür durch eine Kühlung auf 10-20 Imp./s bei 253 K reduziert.
Die Digitalausgänge für die Kanalzahl und die Streuintensität sind für eine digitale Speicherung der Daten und eine off-line Rechnerauswertung der Daten vorgesehen; ein entsprechendes Verfahren wird für das RAMAN-Spektrometer CARY 82 in Abschnitt 4.2 - 4.3 beschrieben.

4.2 Eigenschaften des Spektrometers CARY 82, Erweiterungen

Der Dreifach-Gitter-Monochromator des Spektrometers CARY 82 ist durch den Einstellbereich der spektralen Bandbreite s von 0,5 - 30 cm^{-1} und eine Streulichtunterdrückung besser als $5 \cdot 10^{-10}$ in 10 cm^{-1} Abstand von der RAYLEIGH-Linie für s = 1 cm^{-1} auch für die spektrale Trennung des Streulichts von Substanzmischungen geeignet. Die Analyse der Rotations-RAMAN-Linien erfordert eine Bandbreite s = 0,5-2 cm^{-1}, der Schwingungslinien in Lösungen s = 10 cm^{-1} und der Gas-Schwingungs-RAMAN-Linien s = 10-30 cm^{-1}. Deshalb kann dieses Meßgerät für die Diskussion des Feasibility Index verschiedener Substanzen bzw. der spezifischen Nachweisempfindlichkeit als Bezugssystem dienen.

Aufbau und spektrale Eigenschaften

Die Beschreibung des Aufbaus erfolgt anhand des Blockdiagramms in Abb. 8, dabei wird der Einfluß der einzelnen Meßsystemkomponenten auf die registrierte Streuintensität angegeben.
Zur Streuanregung stehen wahlweise 15 Laserlinien eines Kr^+- und eines Ar^+-Lasers im Spektralbereich λ_o = 455-676 nm mit Ausgangsleistungen von 40 - 1800 mW zur Verfügung. Die Intensität I_o der Laserstrahlung läßt sich sowohl am Auskoppelspiegel des Laser-Resonators als auch, mit einem zusätzlichen Meßgerät, an verschiedenen Orten im Beleuchtungsstrahlengang messen. Die optischen Verluste durch den Vormonochromator (CLAASEN-Filter) zur Abtrennung von Plasmalinien, die verschiedenen Umlenkprismen und die Fokussierlinse schwächen die Anregungsintensität. Am Streuort ist die Intensität der Laserstrahlung abhängig von der Länge des Beleuchtungsstrahlengangs auf etwa $0,3 \cdot I_o$ - $0,5 \cdot I_o$ abgesunken. Die Streuanordnung und die Streugeometrie werden den optischen Eigenschaften der Substanzen angepaßt und bei den entsprechenden Untersuchungen

in Abschnitt 5.1 - 5.3 beschrieben. Im folgenden sind die Daten und Eigenschaften des Spektrometers zusammengestellt, die zur Beschreibung der spektralen Eigenschaften und zur Berechnung des Feasibility Index benötigt werden.

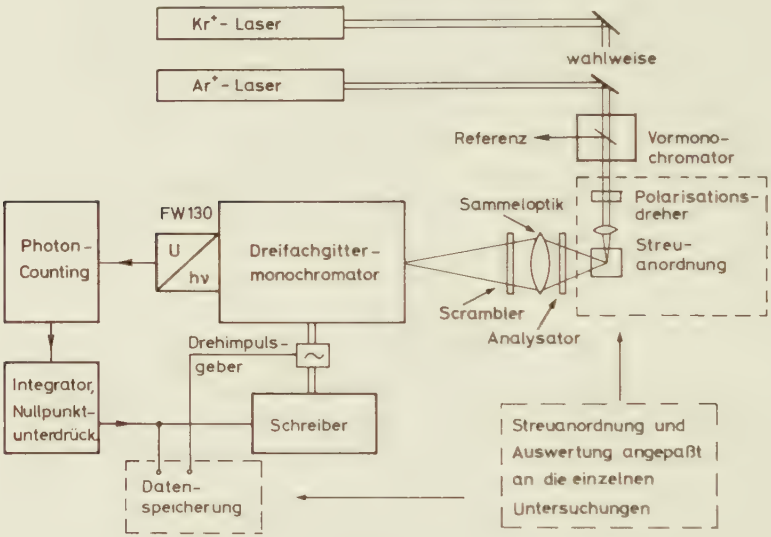


Abb. 8: Blockdiagramm und schematische Darstellung des Aufbaus des RAMAN-Spektrometers CARY 82 mit dem Hinweis auf Veränderungen des Aufbaus in den einzelnen Untersuchungen.

Zum Nachweis des spektral zerlegten Streulichts stehen zwei Verfahren zur Verfügung: eine Photonenzähleinrichtung zur Registrierung von Streuintensitäten bis maximal $2 \cdot 10^5$ Imp./s oder eine Analogregistrierung des verstärkten Multipliersignals. Der Schreiber für die Registrierung der RAMAN-Spektren ist mechanisch an den wellenzahlproportionalen Monochromatorantrieb gekoppelt. Eine optimale Erfassung des Streulichts ist für eine Anpassung des Raumwinkels Ω der Sammeloptik an die Eintrittsapertur des Monochromators gegeben.

Durch die Umkehrung des Strahlenganges der Sammeloptik mit einer Lampe im Monochromator, die den Spalt beleuchtet, läßt sich die Anpassung der Streufläche F_z an die geometrische Spaltfläche untersuchen. Die Strahltaille des fokussierten Strahls beträgt 0,057 mm bei λ_o = 488 nm bzw. 0,021 nm bei λ_o = 647,1 nm. Für eine spektrale Bandbreite s = 10 cm^{-1} ergibt sich in der Streuebene eine Spaltbildbreite von 0,08 bzw. 0,2 mm. Dies bedeutet, daß bei den Gasspektren, die mit λ_o = 488 nm registriert wurden, nur im Bereich s ≥ 10 cm^{-1} eine optimale Anpassung vorliegt. Bei einer Registrierung der Rotations-RAMAN-Spektren mit einer mittleren Bandbreite s = 1 cm^{-1} und λ_o = 488 nm erfaßt der Monochromator nur einen Teil der in den Raumwinkel Ω gestreuten Strahlung; näherungsweise läßt sich der Bruchteil der erfaßten Intensität von der Gesamtintensität durch den Flächenfaktor G beschreiben:

G = Spaltbildbreite / Strahltaille ≈ 0,1 für λ_o = 488 nm, s = 1 cm^{-1}

Die Fehlanpassung verstärkt sich bei einer Multipass-Anordnung, wenn sich durch eine mechanische Instabilität die mehrfach reflektierten Strahlen im Streuzentrum gegeneinander verschieben.

Dieser Effekt einer unterschiedlichen Erfassung der einzelnen Strahlen im Streuzentrum bei kleinen Bandbreiten ist auch im Verlauf der integrierten Intensitäten I_F als Funktion von s (siehe Abb. 9) für N_2- und O_2- Gas zu erkennen. Im Bereich s ≥ 5 cm^{-1} ist die Beziehung

$$I_F \sim s^{2,15}$$

weitgehend erfüllt. Die Potenz 2,15(5) von s stimmt mit der Funktion der drei Monochromatorstufen überein, wobei der dritte Monochromator nur die Streulichtunterdrückung erhöht. Der Verlauf der Maximalintensität I_m bzw. die Abweichung im Bereich s > 10 cm^{-1} von der Proportionalität zu I_F ist auf

die Änderung der "lichtverteilenden" Wirkung mit zunehmender Bandbreite zurückzuführen. Dieses Verhalten läßt sich an der Spaltfunktion des Monochromators erkennen, die aus einer näherungsweise "dreiecksförmigen" in eine mehr

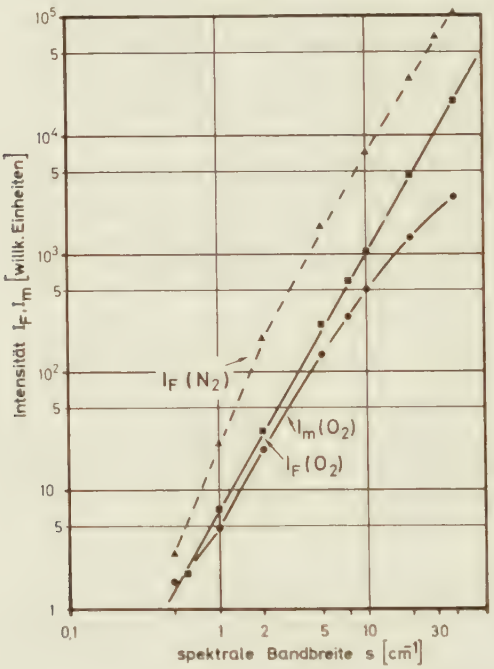


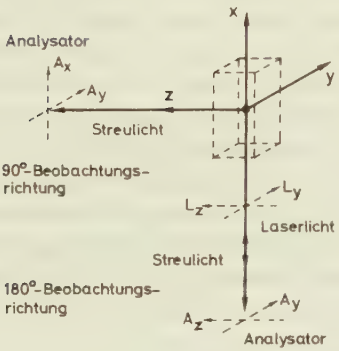
Abb. 9: Maximalintensität I_m und integrierte Intensität I_F des Q-Zweigs von O_2- und N_2-Gas als Funktion der spektralen Bandbreite s, Multipass-Anordnung, λ_o= 488 nm. Die Abweichungen im Bereich s<5 cm^{-1} rühren vom Einfluß des Flächenfaktors her. Die Unterschiede zwischen I_m und I_F des O_2 kennzeichnen die "lichtverteilenden Einflüsse" des Monochromatorsystems.

"trapezförmige" Kurve übergeht. Beim Vergleich der Rotationslinien mit den Schwingungslinien liegt durch die Änderung der Spaltfunktion bei jedem Spektrentyp ein anderes Linien-

profil vor. Bei den Resonanz-RAMAN-Linien dagegen ändert sich die Linienform bei konstanter Bandbreite und Spaltfunktion durch den Resonanz-Effekt.

Streugeometrie und Streulichtkomponenten

Die unterschiedliche Absorption der untersuchten Substanzen, vor allem die starke Absorption des Vollbluts, verhindert die einheitliche Verwendung einer 90°- Streugeometrie, die für transparente Gasproben und nur gering absorbierende Flüssigkeiten den Vorteil geringer elastisch gestreuter Lichtanteile bietet.



Streuung von linear polarisiertem Laserlicht, Polarisationsrichtung L_y oder L_z, Registrierung von 2 Streulichtkomponenten I_x und I_y, bzw. I_y und I_z mit Hilfe der entsprechenden Analysatorstellungen A_i; bei Gasen und verd. Lösungen Streuverhalten durch $\bar{a}'^2$ und γ'^2 beschrieben:

<u>90°- Streuanordnung (z-Richtg.)</u>

L_y: $I_x \sim 3\gamma'^2$; $I_y \sim 45(\bar{a}'^2) + 4\gamma'^2$

L_z: $I_x \sim 3\gamma'^2$; $I_y \sim 3\gamma'^2$

<u>180°-Streuanordnung (-x-Richtg.)</u>

L_y: $I_y \sim 45(\bar{a}'^2) + 4\gamma'^2$; $I_z \sim 3\gamma'^2$

L_z: $I_y \sim 3\gamma'^2$; $I_z \sim 45(\bar{a}'^2) + 4\gamma'^2$

Abb. 10: Zusammenstellung der Streulichtkomponenten für die idealisierte 90°- und 180°- Streugeometrie für verschiedene Polarisationsrichtungen des Laserlichts und verschiedene Analysatorstellungen

Abb. 10 zeigt schematisch die beiden idealisierten Streugeometrien; der kennzeichnende Winkel ist der Winkel zwischen

der Einstrahlungsrichtung x und der Beobachtungsrichtung, d.h. der optischen Achse der Sammeloptik. Bei den stark absorbierenden Blutproben tritt die Absorption sowohl für die Primärstrahlung als auch für das Streulicht auf. SHRIVER, DUNN (L24) vergleichen beide Streuanordnungen für stark absorbierende Proben, bestimmen die "optimale" Konzentration einer Komponente als Funktion der Gesamtabsorption und geben Beziehungen zur Korrektur der registrierten Intensitätswerte an. Der Vorteil der 180°-Streugeometrie liegt dabei in identischen optischen Wegen der Primärstrahlung und des Streulichts.

Zur Bestimmung der Gesamtintensität und des Depolarisationsgrades einer RAMAN-Linie ist bei der Streuung von linear polarisiertem Licht die Registrierung von zwei Streulichtkomponenten erforderlich, die sich durch die Polarisationseigenschaften unterscheiden. Zur Veranschaulichung der verschiedenen Polarisationsrichtungen des Laserlichts und des Analysators für beide Streugeometrien dient Abb. 10, in der die Streulichtkomponenten mit Hilfe der Invarianten des RAMAN-Tensors bezeichnet werden. Die Bezeichnung der einzelnen Streulichtkomponenten bei der Streuung von linear polarisiertem Licht ist in der Literatur nicht einheitlich und wird deshalb anhand der Abb. 10 für diese Untersuchung festgelegt. Die gewählte Bezeichnung stimmt mit der von PLACZEK (L8) bzw. mit der von HESS et al. (L25) überein.

Die Küvette befindet sich im Koordinatenursprung, das Laserlicht wird in x-Richtung eingestrahlt und das Streulicht entweder in z-Richtung (90°) oder in (-x)-Richtung (180°) gesammelt. Die Großen L_y und L_z kennzeichnen die Polarisationsrichtung des Laserlichts, und die Analysatorrichtung A_i ($i = x,y,z$) bestimmt die registrierte Streulichtkomponente I_i. Die Bezeichnungen $I_{\perp}$ oder $I_{\parallel}$ beziehen sich ursprünglich auf die 90°-Geometrie; $\perp$, $\parallel$ bedeuten Einstrahlung von senkrecht (L_y)

bzw. parallel (L_z) zur Beobachtungsrichtung polarisiertem Licht bei einer Analysatorrichtung A_y. Beim Spektrometer CARY 82 entspricht A_y der Stellung "parallel". Die "polarisierte" Komponente $I_\perp$ ist proportional zu $45(\bar{a}'^2) + 4\gamma'^2$ die "depolarisierte" Komponente $I_\parallel$ proportional zu $3\gamma'^2$.
Die Zuordnung der Streulichtkomponenten zu den Tensorinvarianten ist nur im Gültigkeitsbereich der PLACZEKschen Näherung zulässig (vgl. Fußnote S. 16).
Eine allgemeinere Näherung, die auch die Beschreibung der Resonanz-RAMAN-Streuung einschließt, geben PETICOLAS et al. (L27) an. Eine Zuordnung der einzelnen Tensorkomponenten gemäß dieser allgemeinen Näherung zu den Streulichtkomponenten in Abhängigkeit von den Symmetrieeigenschaften der Moleküle führen NAFIE et al. (L26) durch.

Bei der Anwendung der Beziehungen für die Streulichtkomponenten (Abb. 10) sind mehrere Abweichungen von der idealisierten Streugeometrie zu berücksichtigen. Dazu gehört der Einfluß des nicht unendlich kleinen Raumwinkels - der tatsächliche Öffnungswinkel beträgt $45\text{-}50^\circ$ - und der Winkelabhängigkeit der Streuintensität. Hinzu kommt, daß die Analysatorfolie die senkrecht zur Durchlaßrichtung polarisierten Streulichtkomponenten nicht vollständig unterdrückt. Der Einfluß dieser Effekte auf das Meßergebnis ist abhängig vom Verhältnis der isotropen zur anisotropen Streuintensität. Der Fehler bei der Bestimmung des Depolarisationsgrades kann je nach verwendetem Registrierverfahren (s.u.) einige Prozent betragen. Eine Korrektur dieser Störeinflüsse ist möglich - vgl. die Diskussion bei GILSON, HENDRA (L10) oder HESS et al. (L25) -, jedoch für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht erforderlich, da entweder zur Identifizierung der unkorrigierte Depolarisationsgrad ausreicht, oder, wie bei der Resonanz-RAMAN-Streuung des Hämoglobins, nur die Änderung des Depolarisationsgrades von Interesse ist.

Registrierbedingungen und Nachweisempfindlichkeit

Die Beziehungen für die Streulichtkomponenten in Abb. 10 zeigen, daß bei einer Vernachlässigung bestimmter Fehlerquellen die beiden Streulichtkomponenten $I_{\perp}$ und $I_{\parallel}$ entweder durch Drehen der Polarisationsrichtung L_i des Laserlichts oder durch Drehen der Polarisationsrichtung A_i des Analysators bestimmt werden können. Die Zuordnung der Streulichtkomponenten $I_{\perp,\parallel}$ zu den registrierten Intensitäten I_i hängt von der gewählten Streugeometrie und den Registrierbedingungen ab.

Registrierverfahren "A":
(mit Scrambler und Analysatorrichtung A_x und A_y für 90°, bzw. A_z und A_y für 180°, Polarisationsdreher $\Delta = 0°$, linear polarisiertes Licht, Polarisation in Richtung E_y)

$$I_x = I_{\parallel} \cdot E_7$$
$$I_y = I_{\perp} \cdot E_7$$
$$\Rightarrow I_R = \frac{I_x + I_y}{E_7}$$

Registrierverfahren "B":
(ohne Scrambler, ohne Analysator, Messung mit 2 Polarisationsrichtungen des linear polarisierten Lichts in Richtung E_y bzw. E_z mit Hilfe des Polarisationsdrehers, $\Delta = 0°$ bzw. 90°)

$$\Delta = 0°;\ I_a = I_{\perp} \cdot E_4 + I_{\parallel} \cdot E_5$$
$$\Delta = 90°;\ I_b = I_{\parallel} \cdot E_4 + I_{\perp} \cdot E_5$$
$$\Rightarrow I_R = \frac{I_a + I_b}{E_4 + E_5} = \frac{I_a + I_b}{2\,E_1}$$

Tab. 3: Zuordnung der Meßsystemparameter, der Polarisationsrichtung des Laserlichts und des Analysators und der Streulichtkomponenten zur Gesamtintensität mit Hilfe der Korrekturfunktionen E_{1-7} der optischen Nachweisempfindlichkeit des Spektrometers CARY 82

Die optische Nachweisempfindlichkeit E des Monochromators zusammen mit dem Fotomultiplier und der Registrierelektronik ist abhängig von den Polarisationseigenschaften und der Frequenz des Streulichts. Zur Beseitigung der Abhängig-

keit von der Polarisationsrichtung des Lichts dient der "Scrambler", beim CARY 82 ein Quarzkeil, der das polarisierte Streulicht in quasi "natürliches" Licht umwandelt. Ein entsprechender Ausgleich der Frequenzabhängigkeit ist meßtechnisch nicht möglich, stattdessen wird der spektrale Verlauf der optischen Nachweisempfindlichkeit gemessen und als Korrekturfunktion benutzt. Tab. 3 enthält eine Zusammenstellung der experimentellen Meßbedingungen und die Umrechnungsformeln zur Bestimmung der Gesamtintensität I_R für die zwei Registrierverfahren "A" und "B".

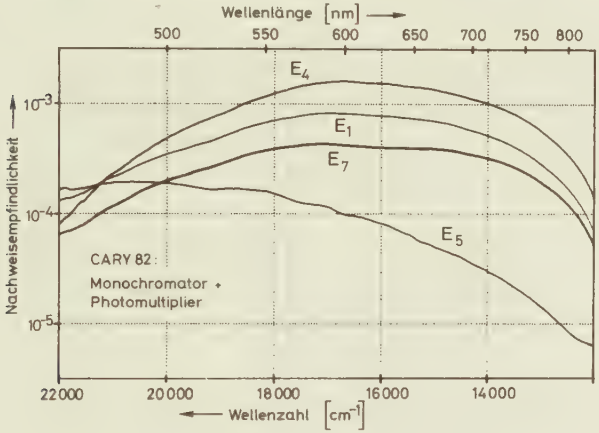


Abb. 11: Spektraler Verlauf der Nachweisempfindlichkeit des Monochromatorsystems und des Fotomultipliers des Spektrometers CARY 82 als Auswertung der registrierten Intensität des Spektrums einer Normallampe.
Tab. 4 enthält die Zuordnung der einzelnen Kurven zu den Registrierbedingungen des Monochromators bezüglich Analysator und Scrambler. Angegeben ist die spektrale Lage eines Meßpunktes als Wellenlänge und als absolute Wellenzahl.

Das Registrierverfahren "A" verwendet in herkömmlicher Weise Analysator und Scrambler zur Bestimmung der beiden Streulichtkomponenten I_x und I_y. Das Registrierverfahren "B" nutzt

dagegen die im gelben und roten Spektralbereich stark ausgeprägte polarisationsabhängige Wirkung des Gittermonochromators aus, um die Intensitätsverluste durch den Scrambler und die Analysatorfolie zu vermeiden. Die Registrierung beider Streulichtkomponenten läßt sich durch Drehen der Polarisationsebene des Laserlichts mit Hilfe des Polarisationsdrehers erreichen.

Den spektralen Verlauf der gesamten Nachweisempfindlichkeit* der Kombination Sammeloptik, Monochromator, Fotomultiplier und Registrierelektronik geben die Kurven E_1, E_4, E_5 und E_7 in Abb. 11 wieder; die einzelnen Kurven beziehen sich auf

Bezeichnung	Streulicht-komponente	Registrierbedingungen (Monochromator)
E_1	$I_\parallel$ oder $I_\perp$	mit "Scrambler", ohne Analysator
E_4	$I_\perp$	ohne "Scrambler", ohne Analysator
E_5	$I_\parallel$	ohne "Scrambler", ohne Analysator
E_7	$I_\parallel$ oder $I_\perp$	mit "Scrambler", mit Analysator
$E_6 = E_4/E_5$	$I_\perp$, $I_\parallel$	wie E_4, E_5

Tab. 4 : Zusammenstellung der Registrierbedingungen und der Bezeichnung der einzelnen Kurven der spektralen Nachweisempfindlichkeit in Abb.11 und 12

unterschiedliche Registrierbedingungen, den Bezug zwischen Registrierbedingung und registrierter Streulichtkomponente stellt Tab. 4 - Bezeichnung für eine 90°-Anordnung - her.

*Die Nachweisempfindlichkeit wurde durch Vergleich mit dem Spektrum einer Wolframbandlampe ermittelt. Der Meßpunktabstand beträgt 5 cm^{-1}, die Meßdaten wurden digital gespeichert und mit einem Rechner pdp 11-40 ausgewertet (digitale Filterung, Berechnung des Sollspektrums). Der spektrale Emissionsgrad des Wolframs wird der Arbeit (L28) entnommen. Die pyrometrische Bestimmung der Strahlertemperatur (ungeeichtes Pyrometer) bedingt den Fehler der absoluten Werte (ca. 30%).

Der Quotient $E_6 = E_4 / E_5$ in Abb. 12 veranschaulicht die polarisationsrichtungs- und wellenlängenabhängigen Eigenschaften des Monochromators, die im Verfahren "B" zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ausgenutzt werden. Der Unterschied in der Transmission des Spektralapparates der beiden Verfahren "A" und "B" beträgt einen Faktor 4, der beispielsweise bei der Streuung in Blut eine Erhöhung der Registriergeschwindigkeit ermöglicht. Im Spektralbereich $\rangle 590$ nm beträgt der Fehler bei der Bestimmung der Streulichtkomponenten nach "B" weniger als 5% der Komponente mit einer Polarisationsrichtung parallel zu A_x bzw. A_z.

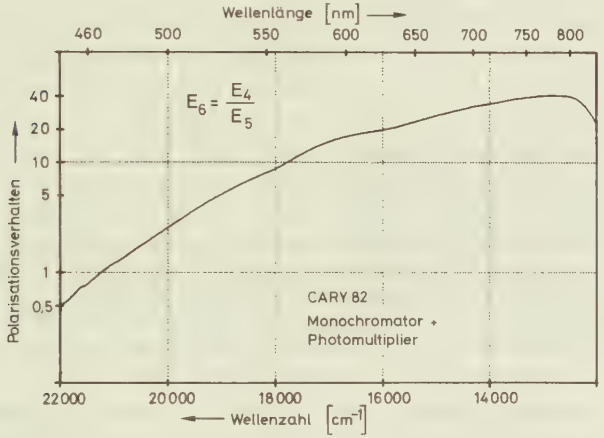


Abb. 12: Polarisationsverhalten des Monochromatorsystems ohne Scrambler und Analysatorfolie (Registrierverfahren "B"). Die unterschiedliche Empfindlichkeit des Monochromators für Streulicht verschiedener Polarisationsrichtung im gelben und roten Spektralbereich ermöglicht eine Trennung des Streulichts mit geringeren optischen Verlusten als beim Registrierverfahren "A" und damit auch eine Verkürzung der Meßzeit.

Die spektrale Nachweisempfindlichkeit wird bei diesen Untersuchungen sowohl zur Korrektur relativer Intensitätswerte einer oder verschiedener Anregungswellenlängen als auch zur

Berechnung des "Feasibility Index" benutzt. Die relative Genauigkeit der Kurven zueinander ist größer als die absolute Genauigkeit der Nachweisempfindlichkeit; die relativen Abweichungen betragen <10 %, der Fehler der absoluten Werte ist durch die Genauigkeit der Meßmethode bestimmt und wird auf ca. 30 % geschätzt. Diese Genauigkeit reicht für die Bestimmung der Größenordnung des "Feasibility Index" aus.

Digitale Speicherung der Meßdaten

Bei der Registrierung der Spektren mit dem Schreiber des CARY 82 wird die Registriergeschwindigkeit der verwendeten Zeitkonstanten angepaßt, um Verzerrungen der registrierten Banden und Fehler bei der Intensitätsbestimmung zu vermeiden. Da bei der Mehrzahl der Spektren die Intensität der Untergrundstrahlung ohne Bedeutung ist, läßt sich bei der Registrierung der Untergrund ohne Informationsverlust durch eine einstellbare Spannung ("Nullpunktunterdrückung") kompensieren. Die Auswertung der Spektren bezüglich RAMAN-Frequenz, Intensität und Depolarisationsgrad einer Linie erfordert bei den überlagerten Spektren eine rechnerische Kurvenanalyse zur Abtrennung der einzelnen substanzspezifischen Linien und zur Unterdrückung des erhöhten Rauschanteils bei einer schnellen Registrierung. Da sich die nachträgliche Digitalisierung der Spektren als sehr aufwendig erwies, wurde das Spektrometer CARY 82 durch eine Auswerte-Elektronik zur Digitalisierung der Meßwerte bei der Messung und zur rechnerkompatiblen Speicherung erweitert*. Die Speicherung der Daten in Form eines 8-Kanal-Lochstreifens in ASCII-Codierung bot die Voraussetzung einer rechnerunspezifischen Auswertung der Daten.

*Die Entwicklung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Bereich für Strukturchemie; den Lochstreifenstanzer stellte der Lehrstuhl Prof. Dr.-Ing. Behrens des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung.

Abb. 13 zeigt ein Blockschaltbild des Gerätes. Eine intensitätsproportionale Spannung läßt sich am Potentiometer des Schreibers abgreifen; als Meßsignal für die Frequenzänderung

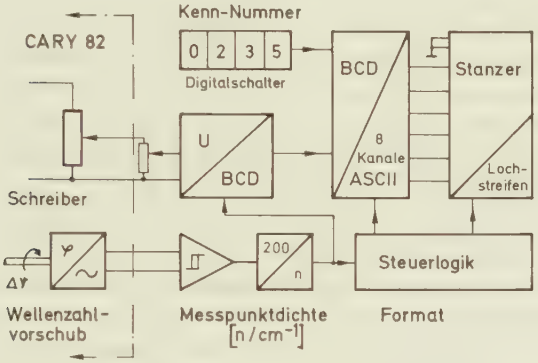


Abb. 13: Blockschaltbild der Auswerteelektronik "RAMANPUNCH" zur Digitalisierung der analogen Meßsignale des Spektrometers CARY 82 , zur Umwandlung in rechnerkompatible ASCII - Werte und zur Ansteuerung eines Lochstreifenstanzers, der eine Speicherung und off-line-Auswertung der registrierten Spektren ermöglicht.
Der analoge Spannungswert wird am Schreiberpotentiometer abgegriffen; ein fotoelektrischer Drehimpulsgeber an der Antriebswelle des Schreibers liefert wellenzahlproportionale Triggerimpulse.

erzeugt ein fotoelektrischer Drehimpulsgeber proportional zur Drehung der Monochromator- und Schreiberantriebswelle elektrische Impulse. Die Lagerreibung der Antriebswelle des Schreibers, die an den wellenzahlproportionalen Monochromatorantrieb gekoppelt ist, ergibt eine ungleichförmige Drehbewegung, so daß eine zeitlineare Abtastung zu Fehlern führen würde. Die gewählte technische Lösung mit dem Drehimpulsgeber unterdrückt den Einfluß dieser ungleichförmigen Bewegung auf die Spektren. Für eine große spektrale Auflösung ist die maximale Impulsrate für 200 Meßpunkte pro cm^{-1} Vorschub (Mpt/cm^{-1}) vorgesehen; für eine geringere

Meßpunktdichte lassen sich die normierten Impulse durch Digitalzähler vorwählbar untersetzen. Die Streuspektren des Citratbluts werden mit 2 Mpt/cm^{-1} und die Rotations-RAMAN-Spektren mit 20 Mpt/cm^{-1} registriert.

Die digitale Aufzeichnung erfolgt parallel zur analogen Schreiberregistrierung der Spektren; die Empfindlichkeit des Spektrometers, die Dämpfungszeitkonstante, die Nullpunktunterdrückung und die Registriergeschwindigkeit sind für beide Verfahren identisch. Zur Abtastung der Signalspannung dient ein Digitalvoltmeter (3 1/2 stellig) mit einem "Sample-Hold-Verstärker", den die am Untersetzerausgang auftretenden Impulse triggern. Der Analogwert wird gespeichert und digitalisiert und steht als BCD-codierter Zahlenwert (0-1999 mV) zur Verfügung. Diese BCD-Werte werden parallel in ein Schieberegister (8 Stellen mit 6 Kanälen) eingespeist, zu vollständigen ASCII-Zeichen ergänzt und zeichenweise seriell dem Stanzer zugeführt. Die verwendeten ASCII-Zeichen beschränken sich auf Zahlen und Sonderzeichen, so daß pro Zeichen nur 6 Kanäle notwendig sind. Der 7. Kanal ist konstant nicht belegt (reserviert für Buchstaben),und der 8. Kanal ist für ein Parity-Bit vorgesehen, das in dieser Ausbaustufe des Geräts nicht erzeugt wird.

Als Sonderzeichen treten die Vorzeichen "+" und "-" bei den Daten, das Zeichen "#" bei den Kennzahlen, Dezimalpunkt oder Lücke (blank) in den Daten oder Kennzahlen sowie "CR" und "LF" zwischen den Datenblöcken auf. Für eine übersichtliche Darstellung der gestanzten Daten auf einem Fernschreiber oder einem Datensichtgerät ist eine Speicherung der Meßwerte wahlweise in Blöcken zu 10 Meßwerten oder als Einzelwert möglich. Zur zusätzlichen Eingabe einer Kenn-Nummer des Lochstreifens, der Zahl der Meßwerte sowie der Anfangs- und Endwellenzahl vor oder nach den Meßdaten auf dem Lochstreifen dient der 4stellige Digitalschalter, dessen Daten

über einen Multiplexer anstelle der Meßdaten in den Parallel-Seriell-Wandler gelangen.

Da die internen Synchronisierungssignale des Lochstreifenstanzers an der Schnittstelle nicht zur Verfügung stehen, erfolgt die Ansteuerung asynchron. Aufgrund der unterschiedlichen Zykluslänge bei der asynchronen Ansteuerung beträgt die Grenzfrequenz der Datenübertragung für eine korrekte Speicherung ca. 4-5 Mpt/s. Ein zeitlicher Abstand $< 0{,}2$ s der Triggerimpulse wird deshalb optisch als Störung angezeigt. Die zeitlich ungleichförmige Bewegung der Antriebswelle schränkt bei niedrigen Drehzahlen die nutzbare Folgefrequenz auf ca. 2 Hz ein.
Die digitale Speicherung der Meßdaten - die Spektrometerdaten werden auf einem zugehörigen Meßblatt festgehalten - bildet die Voraussetzung für eine rechnerische Analyse, die sich off-line durchführen läßt.

4.3 Rechnerische Kurvenanalyse überlagerter Spektren

Die Bestimmung der Maximal- und der integrierten Intensität, der RAMAN-Frequenz und der Halbwertsbreite der Linien, die Abtrennung des Untergrundes, die Trennung überlagerter Linien, vor allem bei den Streuspektren von Blut, sowie die Reduzierung des Rauschanteils lassen sich mit Hilfe einer numerischen Kurvenanalyse durchführen.
Eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses - Reduzierung des Rauschanteils - läßt sich mit verschiedenen Methoden erzielen. Dazu gehören die elektrische Tiefpass-Filterung durch eine Erhöhung der Schreiberzeitkonstanten bei einer verringerten Registriergeschwindigkeit, die on-line oder off-line Mittelwertbildung digitaler oder analoger Meßdaten aus aufeinanderfolgenden Messungen, die off-line Glättung des Kurvenverlaufs mit einem digitalen Filter sowie die Anpassung von Näherungsfunktionen an den Kurvenverlauf. Die ersten beiden Verfahren setzen eine Möglichkeit zur Verlängerung der Meßzeit voraus, die bei der Untersuchung statischer Systeme gegeben ist. Die Erfassung von Zwischenzuständen bei der Oxygenation einer Blutprobe erfordert jedoch eine Reihe schneller Messungen während der Oxygenation. Die rechnerische Glättung mit verschiedenen digitalen Filtern wurde bei der Bestimmung der spektralen Nachweisempfindlichkeit des Spektrometers CARY 82 verwendet. Da die Anpassung einer Näherungsfunktion an die Meßdaten auf einfache Weise das Erkennen und die Trennung überlagerter Linien ermöglicht, ist dieses Verfahren bei der Analyse der Streuspektren von Blut den anderen Methoden überlegen.

Bei dem hier verwendeten Verfahren wird angenommen, daß sich die registrierte Linienform hinreichend genau durch eine einfach zu berechnende Näherungsfunktion wiedergeben läßt. Die registrierte Linienform entsteht durch eine Überlagerung der "natürlichen" Linienform und der Spaltfunktion des Spektral-

apparates. Die Halbwertsbreite einer Laserlinie eines Ar^+-Lasers im "multi mode"-Betrieb beträgt ca. 0,14 cm^{-1}; damit ist ihr Linienprofil gegenüber der Spaltfunktion für $s \leq 0{,}5\ cm^{-1}$ zu vernachlässigen.

Mathematisch läßt sich die Überlagerung als mehrfache Faltung verschiedener Profilfunktionen beschreiben. Die Angabe der natürlichen Linienform erfordert bereits eine Faltung einer GAUSS- und einer LORENTZ-Funktion; die einzelnen Anteile sind für das isotrope und das anisotrope Streulicht verschieden, da sich die Wechselwirkung, die Überlagerung der Rotationsstruktur und verschiedene Relaxationsprozesse unterschiedlich auswirken. Die Spaltfunktion läßt sich bei modernen Gittermonochromatoren nach SUNDIUS (L30) für kleine spektrale Bandbreiten durch eine GAUSS-Funktion bzw. durch ein dreiecksförmiges Profil annähern. Aus der registrierten Linie kann die natürliche Linienform rechnerisch durch eine inverse Faltungsoperation mit der angenäherten oder der experimentell bestimmten Spaltfunktion ermittelt werden. Da die erreichte Meßgenauigkeit bei der Bestimmung der Depolarisationsgrade und deren Resonanzverhalten der Resonanz-RAMAN-Linien nur eine qualitative Auswertung zuläßt, kann die Diskussion mit Hilfe der registrierten Linienform geführt und die rechnerisch sehr aufwendige Durchführung der inversen Faltungsoperation vermieden werden.

Die Berechnung der genäherten Profilfunktion erfolgte zur Rauschunterdrückung und Trennung überlagerter Linien sowie zur Bestimmung der Intensitätswerte und Linienparameter. Für eine Registrierung mit $s < 0{,}1$ HWB sind die Intensitätswerte hinreichend genau und die Änderung der Form im Resonanzfall qualitativ richtig zu ermitteln. Die aufwendige Berechnung der Faltungsfunktion - auch als VOIGT-Funktion bezeichnet - wird hier durch die Verwendung einer erweiterten GAUSS-LORENTZ-Produktfunktion $F(\nu)$ als Näherungsfunktion umgangen.

Eine rechnerische Kurvenanalyse spektroskopischer Meßdaten, vor allem zur Trennung überlagerter Spektren, entspricht dem Stand der Technik. Unterschiede zeigen sich bei der Wahl der Näherungsfunktion, einen Vergleich verschiedener Funktionen führt ZIESSOW (L29) durch, und in der technischen Durchführung der Analyse. Durch die Verwendung eines Datensichtgerätes und eine Entscheidung über die Qualität der erzielten Anpassung anhand der grafisch dargestellten Meß- und Näherungskurven ließ sich der notwendige Rechenaufwand stark reduzieren (vgl. auch DAVIS et al. (L30)).

Die Auswertung der gespeicherten Daten (vgl. 4.2) erfolgt mit einem Programmsystem in der Programmiersprache BASIC für einen Rechner pdp 11-40 mit einem Datensichtgerät*. Das Programmsystem erfüllt die folgenden Aufgaben: Einlesen der Lochstreifen, Umwandlung der Spannungswerte in Impulsraten, Anlegen von Datenfiles (Plattenspeicher), Auswahl von Teilspektren für die optische Darstellung (max. 250 Bildpunkte), Subtraktion des Untergrundes, Anpassung der Amplitude, der GAUSS-LORENTZ-Anteile und der spektralen Lage (Genauigkeit = Meßpunktabstand), Darstellung von Meßkurve, Näherungskurve und Differenzkurve, Berechnung der Intensitätswerte und der Halbwertsbreite mit Fehlerangabe, sowie Speicherung der Differenzkurve für die Abtrennung der nächsten Linie.

---

*Die Rechenzeit wird durch die "langsame" Programmiersprache BASIC und die bei der geringen Kernspeicherkapazität (16 k) notwendige Zerlegung des Programms in Teilprogramme, die nacheinander berechnet werden, bestimmt. Je nach der Zahl notwendiger Näherungsschritte beträgt die mittlere Rechenzeit pro Linie ca. 5 - 15 Minuten. Eine Umsetzung des Programms in die Programmiersprache ASSEMBLER und die inzwischen vergrößerte Kernspeicherkapazität lassen eine Reduzierung der Rechenzeit erwarten.

Als Näherungsfunktion dient die um den Geradenanteil für den Untergrund erweiterte GAUSS-LORENTZ-Produktfunktion:

$$F(\nu) = \underbrace{A' \cdot e^{-B'(\nu-\nu_m)^2}}_{\text{GAUSS-}} \cdot \underbrace{\frac{1}{1+D'(\nu-\nu_m)^2}}_{\text{LORENTZ-}} + \underbrace{E'\nu + F'}_{\text{Geraden-Anteil}}$$

Zur Veranschaulichung des Verfahrens sind in Abb. 14 verschiedene Stadien der Kurvenanalyse dargestellt. In der Meßkurve werden auf dem Bildschirm mit einem Lichtstift zwei Punkte für die Gerade markiert, die im Bereich einer Liniengruppe den Fluoreszenzuntergrund annähert. Nach der

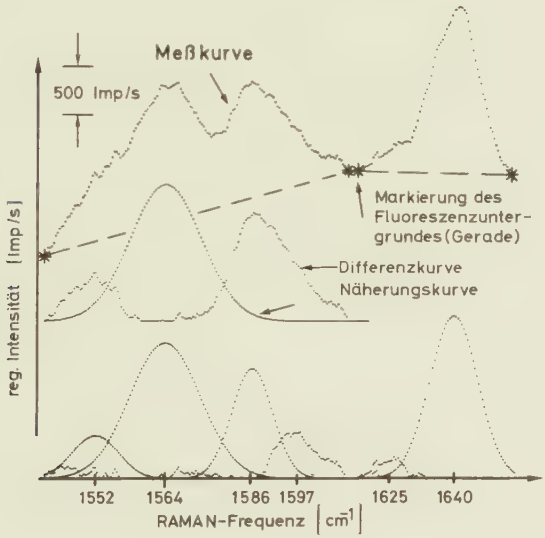


Abb. 14: Darstellung einer digitalisierten Meßkurve mit den Markierungen (Eingabe mit einem "Lichtstift") für die Anpassung des Geradenanteils zur Abtrennung des Fluoreszenzuntergrundes. In der Mitte sind eine Näherungskurve (GAUSS-LORENTZ-Produktfunktion) und die Differenzkurve für eine Resonanz-RAMAN-Linie wiedergegeben. Die Zusammenstellung der Einzellinien und der restlichen Differenzlinien ist unten abgebildet.

Subtraktion des Untergrundes beginnt die Anpassung der Produktfunktion; die Qualität der erreichten Anpassung läßt sich anhand der gleichzeitig dargestellten Meßkurve, der Näherungskurve und der Differenzkurve beurteilen. Die Kurvenparameter werden nacheinander einzeln optimiert; die Parameter B' und D' lassen sich nicht unabhängig voneinander variieren. In der Mehrzahl der Resonanz-RAMAN-Linien reicht die Näherung des GAUSS-Anteils allein (D' = 0) mit einem Fehler < 5 % aus. In Abb. 14 unten sind die berechneten Einzelbanden und die restlichen Differenzkurven, die z.T. noch nicht abgetrennte Linien enthalten, wiedergegeben.

4.4 Interferenzfilterpolychromator, vereinfachter Meßaufbau

Die einfache Struktur der Schwingungs-RAMAN-Spektren von Gasmischungen (vgl. Abb. 3), wie Atem- oder Narkosegasmischungen, führt zu einem technisch einfachen Verfahren zur Zerlegung des Streulichts mittels Interferenzfilter. Obwohl eine Durchstimmung des Transmissionsbereichs der Interferenzfilter durch eine Änderung des Einfallwinkels oder der Filtertemperatur möglich ist, wurden zur technischen Vereinfachung die Filter für einen festfrequenten Transmissionsbereich ausgewählt.

Die gleichzeitige Erfassung des Streulichts mehrerer RAMAN-Linien ermöglicht für die Anwendung in der klinischen Analyse der Atemgase eine simultane Registrierung mehrerer Bestandteile. Bei nur wenigen Bestandteilen und einem räumlich frei zugänglichen Streuzentrum lassen sich mehrere gasspezifische Filter und Detektoren räumlich nebeneinander anordnen. Im Fall polarisierter Laserstrahlung, die zu einer winkelabhängigen Streuintensität führt, und einer Streuanordnung, die nur in einem bestimmten Raumwinkel für die Erfassung von Streulicht zugänglich ist, bildet ein Polychromator mit parallelen gasspezifischen Registrierkanälen die Voraussetzung für diese Anwendung.

Mit diesem Ziel wurden verschiedene optische Anordnungen untersucht, die für die parallele spektrale Trennung verschiedener Streulichtanteile die aufeinanderfolgende Analyse des vom vorhergehenden Filter reflektierten Restlichts ausnutzen. Tab. 5 enthält die Daten eines Satzes von Interferenzfiltern, die für die Analyse von Atemgas ausgewählt wurden, wobei die spektrale Lage ν_m der Durchlaßbereiche für senkrechte Inzidenz ($\theta = 0^\circ$) der der RAMAN-Linien für $\lambda_o = 488$ nm entspricht. Die spektrale Lage für abweichende Winkel läßt sich nach der Formel

$$\frac{\lambda_\theta}{\lambda_{0^\circ}} = \sqrt{\frac{\mu^2 - \sin^2\theta}{\mu^2}}$$

aus den angegebenen Daten berechnen. Ferner sind in Tab.5 die Halbwertsbreite der Filter und der Transmissionsbereich für $T > 10^{-4}$ (nach Herstellerangaben, Fa. Oriel) angegeben,

Gas	$\lambda_m \mid 0°$ [nm]	$\lambda_m \mid 10°$ [nm]	Halbwertsbreite HWB [nm]	[cm^{-1}]	Periodenzahl	10^{-4}-Bereich [nm]	Brechungsindex μ (effektiv)
O_2	528,2	526,4	0,98	36	3	5	2,1
CO_2	522,2	520,4	5,3	193	4	20	2,1
N_2	550,8	548,9	1,92	63	3	10	2,1
Ges.	542,5	540,6	44,0	1503	4	5700	2,1

Tab. 5: Daten eines Satzes von gasspezifischen Interferenzfilter für die Analyse von Atemgasen bei λ_0= 488 nm und θ=0; "10^{-4}-Bereich" beschreibt den Spektralbereich mit einer Transmission $\geq 10^{-4}$ (nach Herstellerangaben).

da neben der Trennung der gasspezifischen RAMAN-Strahlung die Unterdrückung der unerwünschten Lichtanteile eine große Bedeutung für die spektrale Trennung des Streulichts besitzt.

Abb. 15 zeigt die Strahlengänge von 2 optischen Anordnungen (D) , (E) für einen Polychromator und eine schematische Darstellung der Meßmethode zur Bestimmung des Transmissionsgrades der Einzelfilter und der Filterkombinationen. Die Filter werden mit monochromatischem Licht, durch eine Halogenlampe und einen Monochromator erzeugt, beleuchtet und die durchgelassene bzw. reflektierte Intensität mit dem Lock-in-Verstärker-Meßzweig des in 4.1 beschriebenen Spektrometers als Funktion der Wellenlänge registriert. Tab. 6 enthält den Maximalwert der Transmission als Transmissionsgrad T_g. Die räumliche Trennung des eingestrahlten und reflektierten Lichts erfordert eine Abweichung vom Inzidenzwinkel $\theta = 0°$, die mit einer Verringerung der durchgelassenen Intensität

verbunden ist. Durch den Transmissionsgrad von ca. 40 % enthält das reflektierte Licht noch Frequenzanteile des Durchlaßbereichs, so daß eine nochmalige Analyse des Restlichts (Ⓒ mit Hohlspiegel) zu einer Erhöhung der durchgelassenen Intensität führt.

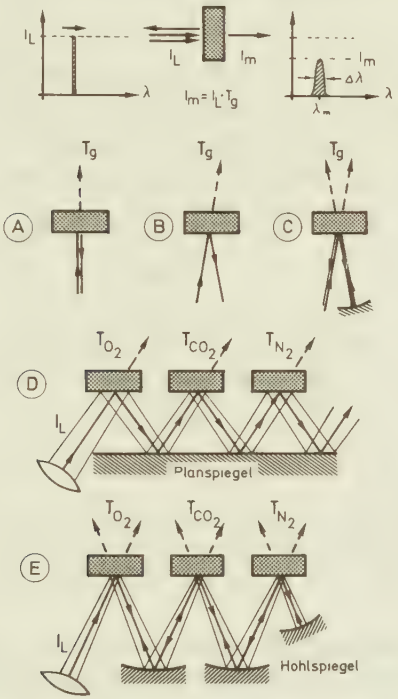


Abb. 15: Schematische Darstellung der Meßmethode zur Untersuchung des Transmissionsgrades einzelner Filter und verschiedener Filterkombinationen. Die Bezeichnung der einzelnen Strahlengänge bezieht sich auf Tab. 6. Für eine simultane Parallelregistrierung wurden die Filteranordnungen E und F untersucht.

In der Anordnung (D) (Abb. 15) mit einem Planspiegel zur Verteilung des Streulichts auf die gasspezifischen Filter treten durch die Divergenz des Streulichts, trotz einer Abbildung des Streuzentrums auf das mittlere Filter, erhebliche Verluste auf. Abhilfe schafft die Verwendung von Hohlspiegeln, mit denen nacheinander eine Abbildung des Streuzentrums auf die einzelnen Filter erreicht werden konnte.

Optische Anordnung	Einzeltransmissionsgrad [%]		
	T_{O_2}	T_{CO_2}	T_{N_2}
(A) Einzelfilter $\theta = 0^o$	40(2)	58(2)	48(2)
(B) Einzelfilter $\theta = 10^o$	32(2)	49(2)	40(2)
(C) wie B, 2x	–	59(3)	–
(D) 3 Filter, Planspiegel	18(3)	35(4)	13(3)
(E) 3 Filter, Hohlspiegel	40(3)	45(3)	32(3)
(E) 3 Filter, Hohlspiegel, 2x	46(4)	55(4)	51(4)

Tab. 6 : Vergleich der mittleren Einzeltransmissionsgrade der gasspezifischen Interferenzfilter - Daten siehe Tab. 5 - in verschiedenen optischen Anordnungen

Die zweimalige Analyse des reflektierten Lichts führt wieder zu einer merklichen Steigerung der durchgelassenen Intensität, so daß der effektive Transmissionsgrad etwa dem der einzelnen Filter (A) entspricht. Das breitbandige Filter mit der Halbwertsbreite von 44 nm und einem Transmissionsgrad von ca. 80% dient zur Vorzerlegung des Streulichts. Die gasspezifische Gesamttransmission beträgt damit ca. 40% bei einer Streulichtunterdrückung für die RAYLEIGH-Linie von ca. 10^{-8} - 10^{-9}.

Die spektrale Lage der Transmissionsbereiche der Filter entspricht für $\theta = 0^{\circ}$ der Lage der RAMAN-Linien einer Atemgasmischung. In der Anordnung (E) sind die Transmissionsbereiche aufgrund der o.a. Beziehung um ca. 2-3 nm ($\theta = 10\text{-}15^{\circ}$) verschoben und verhindern eine direkte Anwendung dieser Anordnung mit dem vorhandenen Filtersatz. Zur Bestimmung der Atemgaskonzentrationen erfolgte daher eine Einzelregistrierung der Bestandteile.

Der Meßaufbau ist in Abb. 16 schematisch dargestellt. Zur Überwachung chemischer Reaktionen anhand gasförmiger Reaktionspartner beschreiben KARGER et al. (L32) eine ähnliche Meßanordnung, die jedoch durch das Fehlen einer Multipassanordnung einen geringeren Feasibility Index aufweist.

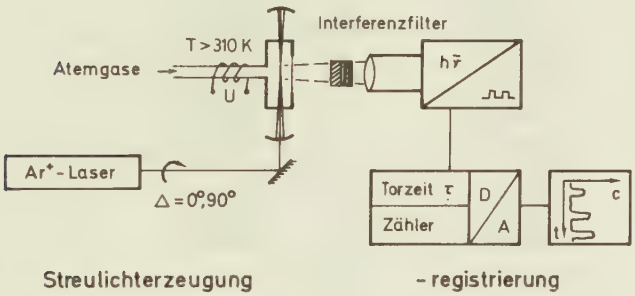


Abb. 16: Aufbau einer vereinfachten Meßanordnung zur Einzelregistrierung des zeitlichen Verlaufs der Atemgaskonzentrationen mit einer geheizten Multipassküvette und gasspezifischen Interferenzfilter zur Zerlegung des Streulichts

Zur Streuanregung dient die blaue Ar^{+}-Laserlinie mit $\lambda_{o} = 488$nm; die Atemluft wird durch eine Durchflußküvette mit Multipass-Anordnung geleitet. Das Streulicht wird durch eine Kombination von 2 Interferenzfiltern, ein breitbandiges und das gasspezi-

fische Filter, spektral zerlegt, durch den gekühlten Multiplier (RCA, C31034) umgewandelt und die gasspezifische Impulsrate als Funktion der Zeit t mit dem in 4.1 beschriebenen Spektrometer (photon-counting-Zweig) registriert.

Abb. 17 zeigt die Durchflußküvette, die einschließlich der Gaszuleitung mit Folienheizelementen auf einer Temperatur höher als die Körpertemperatur gehalten wird. Damit wird eine Kondensation des Wasserdampfes der exspiratorischen Atemluft an den kühleren Küvettenwänden verhindert und

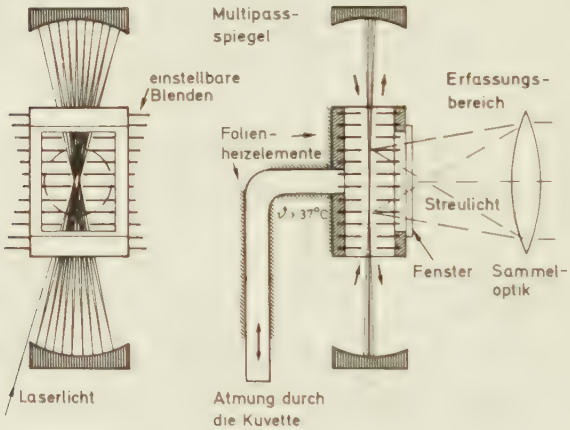


Abb. 17: Aufbau einer heizbaren Durchflußgasküvette mit einstellbaren Blenden zur Reduzierung des elastisch gestreuten Lichtes und der Fluoreszenzstrahlung. Die Ebene des Multipass-Strahlenganges ist um 90° gedreht, um mit der Sammeloptik einen größeren Bereich des Streuzentrums zu erfassen.

sichergestellt, daß keine undefinierte Verringerung des registrierten CO_2-Gehaltes auftreten kann. Die Küvette ist als offene Küvette ohne Brewsterfenster ausgebildet, um

eine vollständige Atmung durch die Küvette zu ermöglichen; das Gesamtvolumen der Meßanordnung beträgt ca. 30 cm^3.

Mit Hilfe der einstellbaren Blenden ließ sich der Streulichtuntergrund um einen Faktor 10 gegenüber einer Quarzküvette reduzieren. Diese Anordnung der Blenden entspricht einer Umkehrung des Strahlenganges früherer Küvetten für eine Hg-Lampe zur Streuanregung, wie sie z.B. von BRANDMÜLLER, MOSER (L9) beschrieben wurden.

Da bei diesem Spektralapparat keine Spalte den Strahlengang begrenzen und die Erzeugung eines "spaltförmigen" Streuzentrums fordern, konnte die Ebene der Multipassanordnung, die durch die mehrfach reflektierten Laserstrahlen gebildet wird, zur Vereinfachung der Justierung und zur Erhöhung der Streuausbeute um 90° gedreht werden. Die Erfassung einer größeren Streufläche reduziert den Einfluß mechanischer Schwankungen und Instabilitäten auf die registrierte Intensität.

5. EINZELUNTERSUCHUNGEN UND DISKUSSION DER MESSERGEBNISSE

Die Einteilung der untersuchten Substanzen in drei Gruppen erfolgte nach den optischen Eigenschaften und dem Auftreten der Resonanzstreuung und berücksichtigt die experimentellen Unterschiede bei den Messungen mit dem Spektrometer CARY 82. Im einzelnen werden die verfügbaren Daten und Streueigenschaften aus der Literatur zusammengestellt, die Besonderheiten des Streuverhaltens erläutert sowie die Änderung der Meßapparatur und die Durchführung der Messungen beschrieben. Daran schließt sich die Diskussion der Meßergebnisse, der Vergleich mit Literaturwerten sowie eine Diskussion von Optimierungsmöglichkeiten zur Reduzierung des technischen Aufwandes an.

5.1 RAMAN-Streuung in den natürlichen Körperflüssigkeiten

Die Körperflüssigkeiten, wie Blut bzw. Blutserum, Harn u.a., stellen sehr komplexe Mischungssysteme dar; Blutserum enthält neben den in Tab. 7 angegebenen Stoffwechselprodukten in höherer Konzentration noch ca. 70 g/l Proteine und ca. 6 g/l Lipide. In Harn tritt neben den angegebenen Substanzen in höherer Konzentration nur noch Hippursäure mit ca. 0,7 g/l auf, die jedoch keine diagnostische Bedeutung besitzt. Wegen dieser komplexen Zusammensetzung der natürlichen Mischungen und der unterschiedlichen Konzentrationen werden die Identifizierung und die Bestimmung der substanzspezifischen Nachweisgrenzen an wässrigen Lösungen der reinen Substanzen durchgeführt.

Die zitierten Übersichtsartikel (L3-L5), (L15) verweisen auf eine Vielzahl von RAMAN-spektroskopischen Untersuchungen biologischer Substanzen, die zur Aufklärung der Molekülstruktur, der Wechselwirkung und des Ablaufs bestimmter biologischer oder biochemischer Reaktionen durchgeführt wurden. Beispiele für diese Reaktionen sind die reversible O_2-Bindung am

Hämoglobin, die Lichtwahrnehmung, die Verkalkung von Gewebe, der Aufbau von Viren und Sporen, die Hapten - Antikörper-Wechselwirkung, Vorgänge in der Zellmembran sowie die Denaturierung und Konformationsänderung von Proteinen und Nucleinsäuren. Der Vorteil der RAMAN-spektroskopischen Analyse wässriger Lösungen liegt im geringen experimentellen Aufwand.

Stoffwechselprodukte in Lösung	KONZENTRATION [mMol/l] (Normalwerte) in		NACHWEISGRENZE in H_2O [mMol/l]	
	SERUM	HARN	λ_o = 647,1 nm $M^{\circ}I_o$ = 0,2 W s = 5 cm^{-1}	λ_o = 488,0 nm $M^{\circ}I_o$ = 1,0 W s = 10 cm^{-1}
Lactat	0,7-2	1 - 7	2	0,05
Pyruvat	0,06-0,3	1,5	5	0,1
Glucose	3 - 7	0,1-0,7	3	0,1
ATP	0,6-1	-	0,5	0,01
Harnsäure	0,1-0,5	0,5-6	2	0,05
Harnstoff	2,5-8	300-600	2	0,05
Kreatinin	0,07-0,15	15-28	1	0,025
Glycin	0,2-0,3	2 - 9	5	0,1
Citrat	0,05-0,2	0,7-6,5	1	0,025
Äthanol fl., 0,1%	(17)	-	3	0,08

Tab. 7: Zusammenstellung der physiologischen Konzentrationen verschiedener Stoffwechselprodukte in Serum und Harn sowie der Nachweisgrenzen in wässriger Lösung für 2 Gruppen von Meßsystemparameter des Spektrometer CARY 82; die Registrierzeitkonstante beträgt τ = 5 s, das S/N-Verhältnis ca. 3:1 und der mittlere Meßfehler ca. 30%.

Die Untersuchungen erfolgten mit dem Spektrometer CARY 82 (vgl. Abb. 8). Zur Streuanregung diente überwiegend die Kr^+-Laserlinie mit λ_o = 647,1 nm; als Streuküvetten wurden Fluoreszenzküvetten oder eine Küvette mit Magnetrührer eingesetzt. Die Registrierung erfolgte analog; zur Bestimmung der Konzentration diente die Maximalintensität der RAMAN-Linien. Für die Erstellung einer Spektrensammlung zur Identifizierung der einzelnen Substanzen in Mischungen wurden die RAMAN-Spektren einer Reihe biochemischer Substanzen als konzentrierte

wässrige Lösung, als Pulver oder, wie bei Äthanol und den Narkosemitteln, in der Gasphase registriert. Die Festkörperspektren sind vor allem für die in Wasser schwerlöslichen Substanzen von Interesse; sie zeichnen sich gegenüber den Lösungsspektren durch eine größere Zahl von RAMAN-Linien aus, die Registrierung erfolgte mit s = 5 cm^{-1}. Die Spektren der Lösungen wurden dagegen in Anpassung an die größere Halbwertsbreite der Linien mit s = 10 cm^{-1} registriert. Wasser als Lösungsmittel erzeugt ein Untergrundspektrum, das den OH- und CO-Valenzschwingungsbereich (etwa 3000 - 3600 cm^{-1}) überlagert. Zur Identifizierung dient deshalb das Teilspektrum im Bereich von 400 - 2000 cm^{-1}, in dem H_2O nur eine breite Schwingungsbande geringer Intensität bei 1640 cm^{-1} aufweist.

In verdünnten Lösungen läßt sich diese Bande als interner Standard verwenden; die Konzentration des H_2O entspricht in reinem Wasser ca. 55 Mol/l und bleibt in verdünnten Lösungen praktisch unverändert. Mit Hilfe dieses Standards wurde der lineare Zusammenhang zwischen der Maximalintensität der Harnstoffbande bei 1000 cm^{-1} (vgl. Abb. 4) und der Harnstoffkonzentration im Bereich von 10 mMol/l - 2 Mol/l im Rahmen der Meßgenauigkeit experimentell bestätigt.
Als Beispiel für das Streuverhalten verschiedener Stoffwechselprodukte werden im folgenden die Streuung an Aminosäuren und Peptiden,an Sacchariden und an Nucleotiden beschrieben und der Bezug der Spektren zur Molekülstruktur erläutert.

Aminosäuren, Peptide, Proteine

Proteine bestehen aus einer Reihe von miteinander verknüpften Peptidketten, die aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind. Bereits bei den niedermolekularen Aminosäuren, vgl. die Spektren in Abb. 18, treten eine Reihe gemeinsamer Linien auf,

die den Aminosäurecharakter kennzeichnen. Es handelt sich um die symmetrische Valenzschwingung der ionisierten COO^--Gruppe, sie liegt für Alanin, Glycin und Prolin bei 1415 cm^{-1} und für Phenylalanin und Glutathion bei 1410 cm^{-1}. Hinzu kommt die symmetrische C-C-Valenzschwingung bei 847 cm^{-1} für Alanin, bei 857 cm^{-1} für Phenylalanin und bei 899 cm^{-1} für Glycin und Prolin. Daneben treten eine Reihe charakteristischer Linien zur Identifizierung der einzelnen Aminosäuren auf; für Glycin ist in Tab. 7 die ermittelte Nachweisgrenze angegeben.

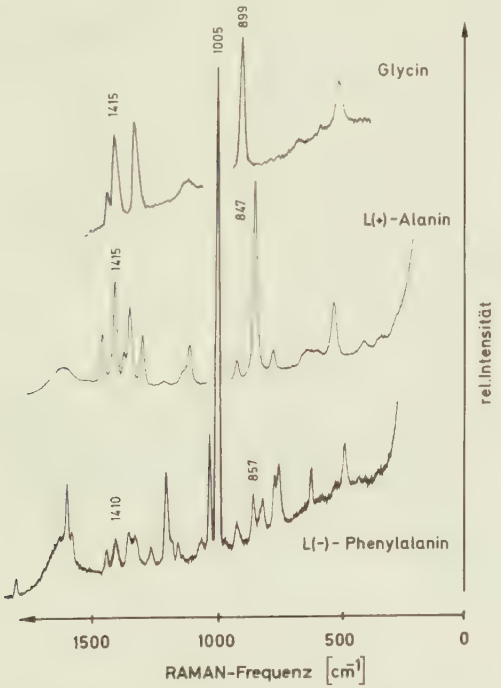


Abb. 18: RAMAN-Spektren von wässrigen Lösungen der Aminosäuren Glycin, Alanin und Phenylalanin; λ_0= 647,1 nm, s= 10 cm^{-1}. Die intensive Linie bei 1005 cm^{-1} wird der Pulsation des Phenylrings zugeordnet.

Die RAMAN-Spektren der Oligopeptide entsprechen nicht einer additiven Überlagerung der Aminosäurenspektren, sondern enthalten charakteristische Veränderungen, die durch die Länge der Peptidkette bestimmt werden. Dies zeigt bereits der Vergleich des Spektrums von Glutathion mit den Spektren der drei verknüpften Aminosäuren. Eine intensive Linie im Bereich von 950 - 1100 cm^{-1} läßt sich der Gerüstschwingung der Peptidkette zuordnen und dient zur Unterscheidung verschiedener Oligomere (L15).
Die Seitengruppen der Aminosäuren bleiben von der Konformation der Peptidkette nahezu unbeeinflußt und kennzeichnen den Aminosäurerest. Die Konformation der längeren Oligo- und Polypeptidketten wird durch eine Gruppe von RAMAN-Banden charakterisiert (L15). Das Auftreten oder Fehlen der verschiedenen Banden im Amid I- (1600-1700 cm^{-1}), im Amid II- (1500-1550 cm^{-1}) und im Amid III-Bereich (1200-1350 cm^{-1}) zeigt das Vorliegen einer α-Helix-, einer β-Faltblatt- oder einer ungeordneten Knäuelstruktur an. Die Strukturänderungen, die bei einer Denaturierung von Proteinen stattfinden, lassen sich durch eine Analyse dieser Bereiche des RAMAN-Spektrums nachweisen (L15).

Ein weiteres Hilfsmittel für die Beobachtung von Strukturänderungen stellen bei Proteinen mit Disulfidbrücken die Schwingungen der C-S-S-C - Gruppe dar, da die Intensitätsverhältnisse der C-S -Schwingungen bei 650 und 680 cm^{-1} und der besonders intensiven Schwingungslinie der Disulfidbrücke bei 500 cm^{-1} eine Bestimmung des Bindungswinkels ermöglichen (LORD, YU (L33)).

Saccharide

Das beobachtete RAMAN-Streuvermögen ist geringer als das der Aminosäuren. Die Spektren der Mono- und Oligosaccharide unter-

scheiden sich in wässriger Lösung nur geringfügig. Da jedoch in den Körperflüssigkeiten im allgemeinen nur Monosaccharide auftreten, ist durch die Streuung nicht identifizierter Polysaccharide keine Störung zu erwarten. Das Spektrum einer wässrigen Glucoselösung in Abb. 19 weist Linien bei 542 cm^{-1}, 1068 cm^{-1} und 1125 cm^{-1} auf.

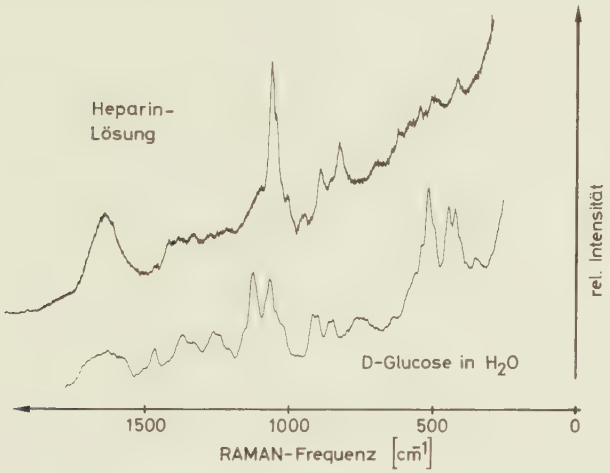


Abb. 19: RAMAN-Spektren der wässrigen Lösungen von Heparin und von Glucose. Das Spektrum der Heparinlösung enthält die RAMAN-Banden des H_2O bei 1640 cm^{-1}; λ_o= 647,1 nm, s= 10 cm^{-1}.

Das Mucopolysaccharid Heparin kommt in den Leukozyten vor und wird klinisch als Antikoagulanz (zur Gerinnungshemmung) verwendet. Das Spektrum der wässrigen Lösung zeigt zwei Banden bei 828 cm^{-1} und 900 cm^{-1}, sowie eine intensive, aus mehreren Linien überlagerte Bande bei 1062 cm^{-1}.

Nucleotide

Nucleotide stellen die Grundbausteine der Nucleinsäuren dar und sind aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einer Pentose und einem Phosphatrest zusammengesetzt. Als Coenzyme sind Nucleotide mit einem oder mehreren Phosphatresten an sehr vielen Stoffwechselprozessen beteiligt. Als Beispiele werden hier die Spektren der Nucleosidphosphate Adenosinmono-, -di-

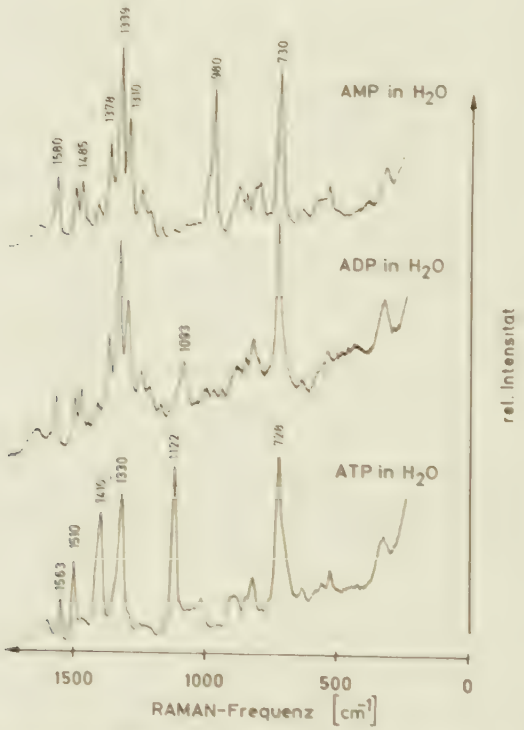


Abb. 20: RAMAN-Spektren von AMP, ADP und ATP in Wasser mit den RAMAN-Linien des neutralen Adeningerüsts bei AMP und ADP bzw. den Linien des protonierten Adeninrings bei ATP, λ_0= 647,1 nm, s= 10 cm^{-1}

und -triphosphat (AMP, ADP und ATP) in Abb. 20 sowie des Dinucleotids Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Abb. 21 diskutiert.

Die Adenosinphosphate spielen beim Energiestoffwechsel als energieübertragende Substanzen eine bevorzugte Rolle; ATP weist im Blut eine Konzentration von ca. 0,4 g/l auf. Kennzeichnende Banden im Spektrum sind die Schwingungslinien des Adeninrings in der neutralen und protonierten Form und die Schwingungslinie des Phosphatrests. Die Spektren von AMP und ADP enthalten die charakteristischen Linien des neutralen Adeningerüsts bei 120-130, 1310, 1335-1340, 1375-1380 und 1480-1485 cm^{-1}. Die Protonierung an einem N-Atom des Purinringes beeinflußt vor allem die vier Linien im Bereich von 1300-1500 cm^{-1}, die in drei Linien bei 1325-1330, 1405-1415 und 1505-1515 cm^{-1} übergehen. Die vollständigen RAMAN-Frequenzen der vier Basen sind in LORD, THOMAS (L3a) oder in (L5) angegeben.

Der Riboserest zeigt das für Saccharide typische geringe Streuvermögen, so daß auf eine Zuordnung der intensitätsschwachen Linien verzichtet wird. Die charakteristischen Schwingungen der Phosphatreste liegen bei 980 cm^{-1} für das Monophosphat, bei 1090 cm^{-1} für das Diphosphat und bei 1125 cm^{-1} für das Triphosphat. Diese Frequenzen sind unabhängig von der Purin- oder Pyrimidinbase; die entsprechende Linie des OMP liegt ebenfalls bei 980 cm^{-1}. Die Linie des Diphosphats wird auch in den Spektren des NAD in Abb. 21 beobachtet.

Das Dinucleotid ist in der oxidierten (NAD) und in der reduzierten Form ($NADH_2$) als Redoxsystem im Stoffwechsel an vielen enzymatischen Reaktionen zur Übertragung von Wasserstoff beteiligt. Das Molekül NAD weist eine am Phosphat verknüpfte ADP-Gruppe auf. Das RAMAN-Spektrum des $NADH_2$ zeigt die charak-

teristischen Linien des neutralen Adeningerüsts; die oxidierte Form besitzt dagegen ein protoniertes Adeningerüst. Die Anlagerung des Wasserstoffs erfolgt am Pyridylring des Nicotinamids, dabei verschwindet die Pulsationslinie

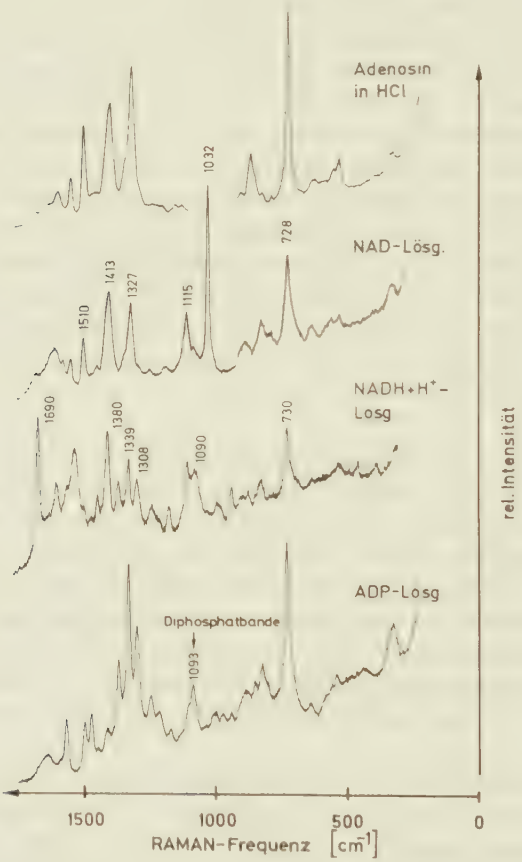


Abb. 21: Vergleich der RAMAN-Spektren einer wässrigen NAD- bzw. $NADH_2$-Lösung mit den Spektren einer ADP-Lösung (neutraler Adeninring) bzw. von Adenosin in HCl(pH 3, protonierter Adeninring)

des konjugierten Pyridylringes bei 1030 cm^{-1}. Die Intensität dieser Bande bietet in Verbindung mit der Linie des Adeninringes bei 720-730 cm^{-1}, die ein Maß für die Gesamtkonzentration von NAD + $NADH_2$ darstellt, die Möglichkeit, das Konzentrationsverhältnis von NAD und $NADH_2$ als normierte Meßgröße zu bestimmen. Zur Unterscheidung des $NADH_2$ von den anderen Adenosinderivaten mit neutralem Adeninring kann die Linie bei 1690 cm^{-1} benutzt werden.

Das Auftreten charakteristischer Linien der Mononucleotide in den Spektren der Polynucleotide ermöglicht eine RAMAN-spektroskopische Analyse der Ribonucleinsäuren und der Deoxyribonucleinsäuren lebender Sporen und Viren (vgl.(L5)). Die Konformation der Polynucleotide wird durch die räumliche Anordnung des Phosphat-Zucker-Gerüsts bestimmt. In wässriger Lösung charakterisiert das Intensitätsverhältnis der symmetrischen Valenzschwingungen der O-P-O -Gruppe und der PO_2-Gruppe bei 814 und 1100 cm^{-1} die Raumstruktur der Nucleinsäuren (L5), L15).

Das RAMAN-Streuvermögen der drei Substanzgruppen nimmt im Mittel in der Reihenfolge Nucleotide - Aminosäuren - Saccharide ab. Die Identifizierung der Bestandteile ist in einfachen wässrigen Mischungen und in den Oligomeren der Aminosäuren oder der Nucleotide möglich. Mit zunehmender Größe der Moleküle (Peptide, Proteine, Nucleinsäuren) treten zusätzliche Banden auf, die die räumliche Struktur kennzeichnen. Biochemische Reaktionen, die Strukturveränderungen verursachen, lassen sich deshalb RAMAN-spektroskopisch erfassen.

Nachweisempfindlichkeit

Für einen Nachweis geringer Konzentrationen erweisen sich RAMAN-Linien großer relativer Intensität als besonders geeignet; typische Beispiele sind die Schwingungslinie von Harnstoff (Abb. 4) bei 1000 cm^{-1} durch die Resonanz der

C = N - und der C = O - Schwingung, die Pulsationslinie des Phenylrings von Phenylalanin (Abb. 18) bei 1005 cm^{-1} oder die besonders intensive Schwingungslinie der Disulfidbindung in Cystin oder in Proteinen bei 500 cm^{-1}.

Je nach der Zusammensetzung einer Mischung und der daraus herrührenden Überlagerung der Linien im Spektrum müssen verschiedene Linien des RAMAN-Spektrums zur Identifizierung benutzt werden. Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfordert normalerweise die Zuordnung mehrerer Linien, um die Treffsicherheit zu erhöhen. Eine Ausnahme bildet die Überwachung von Konzentrationsänderungen in Mischungen bekannter Zusammensetzung.

Für einen Vergleich der spektralen Lage und der relativen Intensität der intensivsten Linien der Spektren verschiedener Stoffwechselprodukte sind in Abb. 22 die Impulsraten der einzelnen Linien wässriger Lösungen mit einer auf 1 Mol/l normierten Konzentration dargestellt. Zum Vergleich mit diesen substanzspezifischen Werten sind als Untergrund das H_2O-Spektrum und die Fluoreszenzstrahlung in Serumproben in das Diagramm eingetragen. Die Intensitätswerte beziehen sich auf die angegebenen Spektrometerdaten; durch andere Bezugsdaten, d.h. durch geänderte Meßbedingungen, wie λ_o = 488 nm, I_o = 1 W und s = 10 cm^{-1}, läßt sich ein Steigerungsfaktor 40 für die Registrierung mit dem CARY 82 erzielen. Diese Steigerung gilt auch für die in Tab. 7 angegebenen Nachweisgrenzen, die sich ebenfalls auf die Meßparameter der Abb. 22 beziehen.

Die Genauigkeit dieser Nachweisgrenzen wird durch verschiedene Fehlerquellen bestimmt. Die Konzentration der Lösungen läßt sich zwar mit großer Genauigkeit bestimmen; die Reproduzierbarkeit der Intensitätsbestimmung innerhalb einer Meßreihe mit denselben Spektrometerdaten wird jedoch bereits durch geringe Änderungen im Beleuchtungsstrahlengang beim

Auswechseln der Küvette eingeschränkt. Die Abweichungen betragen < 10%. Die Übereinstimmung der Intensitätswerte aus verschiedenen Meßreihen, bei denen nur zum Teil die H_2O-Bande zur Normierung verwendet werden konnte, mit unterschied-

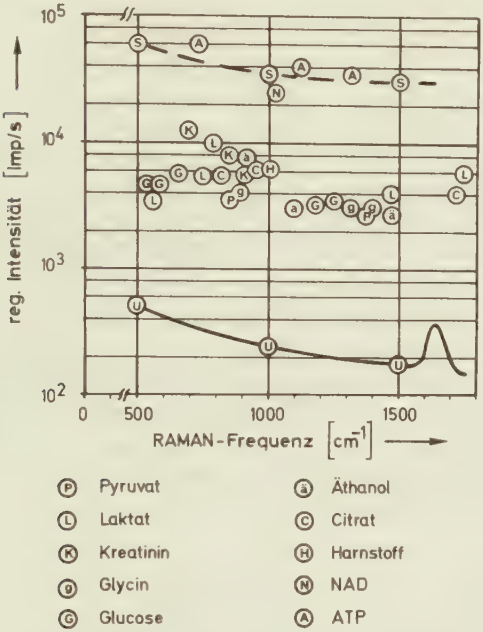


Abb. 22: Darstellung der RAMAN-Frequenzen und der spezifischen Intensitäten der intensivsten RAMAN-Linien verschiedener Stoffwechselprodukte in wässriger Lösung; Konzentration 1 Mol/l, λ_o= 647,1 nm, MI_o =0,2 W, s= 5 cm^{-1}. Zum Vergleich sind das Untergrundspektrum (U) von H_2O (schematisch) und die Fluoreszenzintensität (S) typischer Blutserumproben abgebildet.

lichen Spektrometerjustierungen ist ungünstiger. Als Nachweisgrenze wurde die Konzentration gewählt, bei der die Maximalintensität der substanzspezifischen Bande etwa die dreifache Intensität des Rauschens der Untergrundintensität (Signal-Rausch-Verhältnis 3:1) für die angegebenen Meßparameter erreicht.

Die angegebene Steigerung der Nachweisempfindlichkeit gilt für die Substanz und für das Untergrundspektrum; der Einfluß einer größeren Zeitkonstanten ist nicht berücksichtigt. Für die physiologische Harnstoffkonzentration in Blutserum von ca. 6 mMol/l und die optimierten Registrierbedingungen beträgt der Feasibility Index ca. 10^{-15}.

Fluoreszenzstrahlung

Als wesentlicher Störeinfluß bei der RAMAN-Streuung in den Körperflüssigkeiten ist die Fluoreszenzstrahlung anzusehen. Ihre Intensität entspricht für Serum (Abb. 22) der Streuintensität der Nucleotide mit einer Konzentration 1 Mol/l; der Normalwert von ATP im Serum liegt dagegen bei ca. 1 mMol/l. Die Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Anregungswellenlänge; das Fluoreszenzspektrum erstreckt sich auf der langwelligen Seite der Anregungslinie über den gesamten sichtbaren Spektralbereich. Als fluoreszenzfähige Substanzen sind in den natürlichen Körperflüssigkeiten neben den hochmolekularen Proteinen eine Reihe chromophorer Substanzen enthalten, die einen Teil der beobachteten Fluoreszenz verursachen.

Freies Bilirubin, das in dieser Form wasserunlöslich ist, dient bei den Fluoreszenzuntersuchungen als Vergleichssubstanz. Die Spektren für λ_o = 482 nm sind in Abb. 23 wiedergegeben. Die Spektren sind weder bezüglich der Absorption bei der Streuung in der Rührküvette mit einer 90°-Streugeometrie noch bezüglich der Spektrometerempfindlichkeit korrigiert. Zum Vergleich ist deshalb der relative Verlauf der Spektrometerempfindlichkeit (F) zusätzlich in Abb. 23 eingetragen.

Bei allen Substanzen tritt eine breitbandige Fluoreszenzstrahlung auf, die die RAMAN-Intensität der einzelnen Bestandteile überdeckt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten sind bei einer Anregung mit den Laserlinien bei 482 und 647 nm

vergleichbar, bei einer Anregung mit 521 nm oder 568 nm dagegen größer. Für eine klinische Anwendung ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zur RAMAN-Intensität entscheidend. Als typisches Beispiel wird der Nachweis der physiologischen Harnstoffkonzentration im Blutserum und im Harn

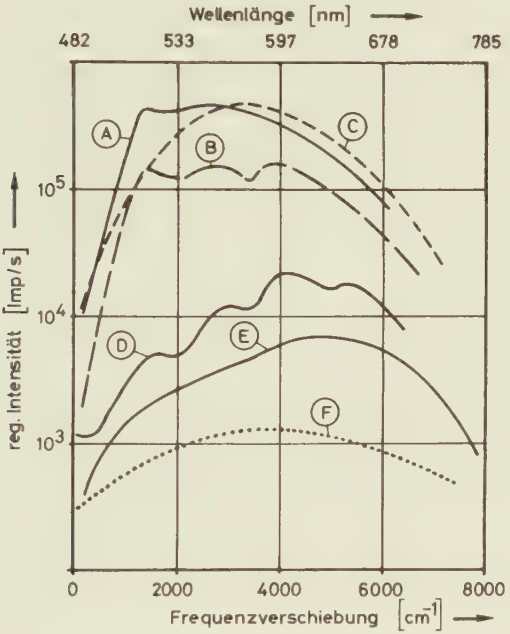


Abb. 23: Zusammenstellung der Fluoreszenzspektren von Blutserum - (A) hellgelb gefärbt, (B) durch Hämolyse rot gefärbt -, von Harn (C), von verdünntem und hämolysiertem Citratblut (D) und von Bilirubin in CCl_4 (E) für gleiche Meßbedingungen: λ_o= 482 nm, M I_o= 10 mW, s= 10 cm^{-1}. Dargestellt ist die registrierte Intensität ohne eine Korrektur der Absorption oder der spektralen Nachweisempfindlichkeit. Zum Vergleich ist der spektrale Verlauf der Nachweisempfindlichkeit (F) (Bezug auf die Laserintensität in mW, in willkürlichen Einheiten) angegeben.

gewählt. Für die Streuung in Blutserum mit einer Harnstoffkonzentration von ca. 10^{-3} Mol/l ergeben sich für 482 nm und 647 nm übereinstimmende Intensitätsverhältnisse von ca. $5 \cdot 10^{4}$: 1; die Streuung in Harn führt durch die größere Harnstoffkonzentration von 0,4 Mol/l zu ca. 30 : 1.

Die Harnstoffkonzentration in Harn stellt jedoch eine extreme physiologische Konzentration dar, so daß im Normalfall bei der RAMAN-Streuung in den Körperflüssigkeiten die Fluoreszenzintensität die RAMAN-Intensität um mehrere Größenordnungen übertrifft. Abhilfe schaffen hier nur Meßverfahren, die entweder eine Trennung des RAMAN-Streulichts und der Fluoreszenzstrahlung ermöglichen oder zu einer RAMAN-Streuung in einem fluoreszenzfreien Bereich führen, wie z.B. die kohärente anti-STOKESsche Streuung "CARS" (L35), oder bei denen vor der Streuung die fluoreszierenden Substanzen, wie Hämoglobin, Bilirubin u.a., abgetrennt werden.
Zur Abtrennung hochmolekularer Substanzen im Blut läßt sich nach Art der Hämodialyse ein Diaphragma einsetzen, durch das nur eine Reihe niedermolekularer Stoffwechselprodukte in die angrenzende wässrige Lösung diffundieren können. Eine technische Lösung dieses Verfahrens zur kontinuierlichen Probentrennung vor der Lichtstreuung läßt sich als Membrankatheter denken, wobei für eine praktische Anwendung die Erhöhung des Feasibility Index und die Verringerung des technischen Aufwands durch ein Multipassverfahren von entscheidender Bedeutung sind.

Als meßtechnisches Verfahren zur Trennung des RAMAN-Streulichts von der Fluoreszenzstrahlung dürfte sich die unterschiedliche Lebensdauer der Zwischenzustände ausnützen lassen, die bei einer Streuanregung mit kurzen Laserimpulsen zu einem zeitlich unterschiedlich verzögerten Intensitätsanstieg führt (vgl. GILSON, HENDRA (L10)).

Eine Möglichkeit zur Streuanregung in einem fluoreszenzfreien Bereich stellt das Verfahren der "kohärenten anti-STOKESschen RAMAN-Streuung (CARS)" dar, das bereits 1963 von TERHUNE entdeckt wurde, aber erst seit der Anwendung durchstimmbarer Laser für die RAMAN-Streuung starkfluoreszierender Substanzen an Bedeutung gewonnen hat (BEGLEY et al. (L35)).

Die letzten beiden Verfahren sind mit einem großen technischen Aufwand verbunden, darüberhinaus dürfte bei der "CARS" die nichtlineare Konzentrationsabhängigkeit der Streuintensität eine Anwendung erschweren. Im Gegensatz dazu lassen sich für die Konzeption eines Membrankatheters die für wässrige Lösungen ermittelten Nachweisgrenzen und das Streuverhalten der Stoffwechselprodukte heranziehen.

5.2 Resonanz-RAMAN-Streuung in Blut

Führt man die Lichtstreuung in Vollblut oder Citratblut natürlicher Zusammensetzung statt in Blutserum durch, so verstärkt sich die Fluoreszenz; gleichzeitig tritt eine Absorption des eingestrahlten Laserlichts sowie der Streu- und Fluoreszenzstrahlung in der Probe auf. Die chromophoren Bestandteile, wie das Hämoglobin in den Erythrozyten, bieten jedoch die Möglichkeit zur Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung bei einer Streuanregung im Bereich der elektronischen Absorptionsbanden. Zur Aufklärung des Vorganges der reversiblen O_2-Bindung an das Eisenzentralatom der Hämgruppe wurde die Resonanz-RAMAN-Streuung der Hämproteine bisher nur an sorgfältig gereinigten, verdünnten und gekühlten Hämoglobinlösungen durchgeführt. Diese Probenvorbehandlung ist bei einer Anwendung zur Bestimmung der Sauerstoffsättigung von Vollblut nicht möglich.

Die Untersuchung einer Suspension von intakten Erythrozyten durch BRUNNER, SUSSNER (L36) zeigte bereits, daß nur der chromophore Teil der Blutzellen selbst zu registrierbaren Spektren führt. Die Fluoreszenz überdeckt die nicht resonanzverstärkten RAMAN-Linien der Zellmembran, ein Spektrum ist bei BULKIN (L37) angegeben, ebenso wie die des Blutplasmas. Die Konzentration von $0{,}8\text{-}1{,}0 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Hämgruppen in Blut unterscheidet sich von der "optimalen" Konzentration von 10^{-4} - 10^{-5} Mol/l einer 90°-Streugeometrie bei der Untersuchung der Hämoglobinlösungen. Die hohe Konzentration erfordert den Übergang zu einer 180°-Streugeometrie, die gleichzeitig die experimentellen Schwierigkeiten durch nicht reproduzierbare Intensitätsänderungen beseitigt.

Resonanz-RAMAN-Streuung der Hämproteine

Die Eigenschaften der Resonanz-RAMAN-Streuung von Proteinen mit einer Hämgruppe sind in verschiedenen Arbeiten ausführlich

dargestellt, z.B. bei SPIRO, STREKAS (L38), SPIRO (L18) oder LEWIS, SPOONHOWER (L39), so daß hier nur kurz auf das Streuverhalten des Hämoglobins eingegangen wird. Abb. 24 zeigt die Struktur der Hämgruppe; die Symmetrie des Moleküls wird beim Hämoglobin durch die Einbeziehung der Vinylgruppen in die Konjugation des Porphyrinringes stärker als beim Cytochrom C

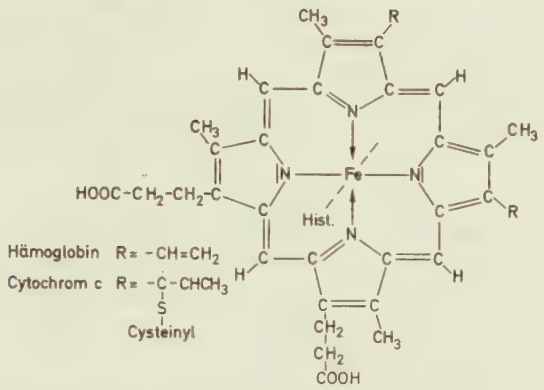


Abb. 24: Struktur der Hämgruppe mit der Angabe der Seitengruppen R für Hämoglobin und für Cytochrom C. Die Einbeziehung der Doppelbindung der beiden Vinylgruppen in die Konjugation des Porphyrinringes stört beim Hämoglobin die Symmetrie der Hämgruppe. Das O_2-Molekül wird an der freien Koordinationsstelle des Fe-Atoms angelagert.

gestört. Das O_2-Molekül wird als O_2^- an der freien Koordinationsstelle des Eisenzentralatoms angelagert; dabei ändert das Fe-Atom die Oxidationsstufe und den Spinzustand : DeoxyHb mit Fe(II), high spin bzw. OxyHb mit Fe(III), low spin (L39).

Das Fe(III)-Atom paßt in den Zentralraum des Porphyrinringes; das Fe(II)-Atom besitzt dagegen einen größeren Durchmesser. Dadurch wird im deoxygenierten Zustand das Eisenatom um ca. 0,08 nm aus der Porphyrinringebene herausgedrückt. Der Porphyrinring verliert die ebene Struktur und geht in einen

"gewölbten" und "gewellten" Ring über. Die Bewegung des Fe-Atoms bei der O_2-Anlagerung axial zur Porphyrinringebene löst die Strukturänderung des Proteins von der DeoxyHb- zur OxyHb-Quartärstruktur aus. Die zusätzliche Bewegung des Histidins der Proteinkette, das an die 6. Koordinationsstelle angelagert ist, beschleunigt den Umklappvorgang. Die Strukturänderung im Bereich der Hämgruppe wirkt sich auf die Schwingungsfrequenzen aus. Sowohl der räumliche Abstand und der unterschiedliche Durchmesser des Fe-Atoms als auch die Deformation des ebenen Ringes beeinflussen die Überlappung der d-Orbitale des Fe-Atoms mit den π^*-Orbitalen des konjugierten Rings, die Kraftkonstanten sowie die Valenzschwingungen der Ringatome (L39).

Die RAMAN-Spektren der Hämproteine enthalten nur die Linien der Porphyrinschwingungen, die durch die Resonanz mit den zwei elektronischen π-π^*-Übergängen im sichtbaren und nahen UV-Spektralbereich verstärkt werden. Die Resonanz-RAMAN-Linien im Bereich von 1000-1700 cm^{-1} gehören zu den Valenzschwingungen der C-C - und der C-N -Atome in der Porphyrinringebene. Die einzelnen Linien unterscheiden sich durch den Depolarisationsgrad, die spektrale Lage des Resonanzbereichs sowie durch das Resonanzverhalten der Intensität, das Anregungsprofil, oder des Depolarisationsgrades.
Abb. 25 enthält das Absorptionsspektrum von Oxy- und Deoxy-Hämoglobin (nach LAING et al. (L40)) mit den Absorptionsbanden der beiden Elektronenübergänge, der SORET- oder γ-Bande bei 400-420 nm und der α-Bande bei 577 nm (OxyHb). Die Seitenbande oder β-Bande bei 541 nm (OxyHb) entsteht durch eine Schwingungswechselwirkung zwischen den beiden Übergängen. Bei DeoxyHb sind die α- und die β-Bande überlagert, das Maximum liegt bei 555 nm (BETKE (L41)).

Durch die Art der Wechselwirkung lassen sich zwei Typen von Schwingungen unterscheiden; Typ A steht in Resonanz mit der

SORET-Bande und wird durch die Wechselwirkung mit einem angeregten Zustand erklärt (FRANCK-CONDON-Überlappung, vgl.Abb.1 bzw. ALBRECHT (L42)), durch die jedoch nur totalsymmetrische

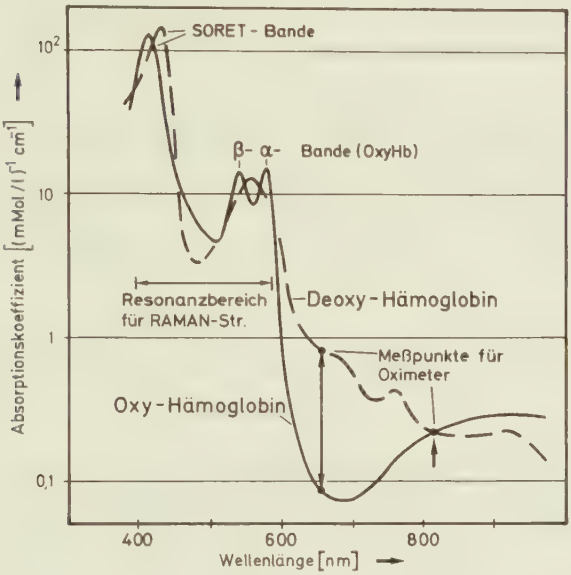


Abb. 25: Molarer Extinktionskoeffizient des Oxy- und des Deoxyhämoglobins als Funktion der Wellenlänge nach einer Darstellung von LAING et al.(L40).Die Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung tritt nur im Spektralbereich < 600 nm auf; die beiden Pfeile bei ca. 650 nm und bei 800 nm kennzeichnen typische Wellenlängen für eine oximetrische Bestimmung der Sauerstoffsättigung.

Schwingungen mit polarisierten Linien verstärkt werden. Typ B steht in Resonanz mit der α- und der β-Bande und entsteht durch die Wechselwirkung der beiden Übergänge zu verschiedenen angeregten Niveaus (vgl. PETICOLAS et al. (L27), (L38)). Die aktiven Schwingungen dieser Resonanz gehören

zu verschiedenen Rassen. Nimmt man für die ungestörte Hämgruppe idealisiert die Symmetrie einer D_{4h}-Punktgruppe an, so lassen sich die beobachteten Linien den Schwingungsrassen B_{1g}, B_{2g} und A_{2g} zuordnen, wobei die Schwingungen der Rasse A_{2g} nur im Resonanzfall aktiv werden und dem antisymmetrischen Teil des Streutensors entsprechen. Die Schwingungen des Typs A gehören zur Rasse A_{1g}.

Durch die Störung der Hämsymmetrie lassen sich jedoch auch im Bereich der β-Resonanz polarisierte Linien beobachten (z.B. bei λ_o = 514,5 nm). Die Notwendigkeit einer Kombination verschiedener Tensorkomponenten für die Beschreibung des Resonanzverhaltens der anomal polarisierten Linien führen COLLINS et al. (L43) ebenfalls auf die gestörte Symmetrie zurück.

Die folgende Zusammenstellung enthält die Anregungswellenlängen der publizierten Spektren reiner Hämoglobinlösungen mit der Angabe des Depolarisationsgrades der Linien getrennt nach den Spektral- bzw. Resonanzbereichen.

"blauer" Spektralbereich (450-500nm)	γ-Resonanz	pol. Linien (L38) 458 nm, (L45) 442 nm, (L36) 488 nm ,
"grüner" Spektralbereich (500-540 nm)	β-Resonanz	pol. + dep. Linien (L38) 515 nm, 531 nm,
"gelber" Spektralbereich (540-600 nm)	α-Resonanz	dep. + anom. pol. Linien (L45) 568 nm, (L46) 562-615 nm.

Das Resonanzverhalten der Intensität und des Depolarisationsgrades wurde von COLLINS et al. (L43) für Cytochrom C berechnet; die Ergebnisse lassen sich qualitativ auf das Verhalten der Hämoglobinlinien übertragen. Kennzeichnend für das Resonanzverhalten ist der Depolarisationsgrad.
Tab. 8 enthält die Frequenzen von 6 Hämoglobinlinien für die oxygenierte und deoxygenierte Form. Die Linien wurden alphabetisch bezeichnet (L38). Die Zuordnung der Linien C(ap) und

D(p) zur Änderung des Spinzustandes (L38) wird in neueren Untersuchungen, z.B. von WOODRUFF et al. (L47), an anderen Metalloporphyrinen in Zweifel gezogen und durch die Strukturänderung erklärt. Die sechs Linien lassen sich in den entsprechenden Resonanzbereichen zur Bestimmung der Sauerstoffsättigung ausnutzen.

Zuordnung der RAMAN-Linien	RAMAN-Frequenzen $[cm^{-1}]$		Symmetrierasse
	OxyHb	DeoxyHb	
A(p)	1377	1358	A_{1g}
B(dp)	1564	1546	$B_{1g} + B_{2g}$
Ć(ap)	1586	1552	A_{2g}
D(p)	1582	1565	A_{1g}
E(p)	1506	1565	A_{1g}
F(dp)	1640	1607	$B_{1g} + B_{2g}$

Tab. 8: Liste der charakteristischen RAMAN-Frequenzen verschiedener Hämoglobin-Resonanz-RAMAN-Linien für beide Formen des Hämoglobins mit der Angabe des Depolarisationstyps und der Symmetrierasse der Schwingung; die Bezeichnung erfolgt alphabetisch, Angaben nach SPIRO, STREKAS (L38).

Die verschiedenen Hämoglobinformen zeigen nur zum Teil ein unterschiedliches Verhalten; die Unterschiede in den RAMAN-Spektren von Methämoglobin und Hämoglobin in beiden Oxidationszuständen sind gering (L36), (L38). Das Spektrum von CO-Hämoglobin entspricht bis auf die stärkere Photodissoziation dem Spektrum von OxyHb (L38); stärkere Unterschiede zeigt nur das Spektrum von NO-Hämoglobin (L64).

Meßanordnung

Die Lichtstreuung an Blutproben in den Fluoreszenzküvetten,

d.h. an nicht bewegtem Blut, führte zu nichtreproduzierbaren Schwankungen der Fluoreszenzintensität. Dies läßt sich durch eine lokale Erhitzung und Thermokonvektion, die die absorbierte Strahlung verursacht, durch eine Denaturierung oder eine Photodissoziation des Blutes vor allem im blauen Spektralbereich sowie durch das zeitliche "Abklingverhalten" der Fluoreszenzintensität nach dem Beginn der Lichteinstrahlung erklären. Abhilfe bietet die in Abb. 26 dargestellte Streuanordnung mit einem "künstlichen Blutkreislauf".
Die Bluttemperatur läßt sich mit Hilfe des doppelwandigen Oxygeniergefäßes und des Thermostatkreislaufes zwischen 290 K und 310 K einstellen. Zur Oxygenation bzw. Deoxygenation wird O_2- bzw. N_2- Gas eingeleitet. Der gesamte Versuchsaufbau befand sich im Probenraum des Spektrometers.

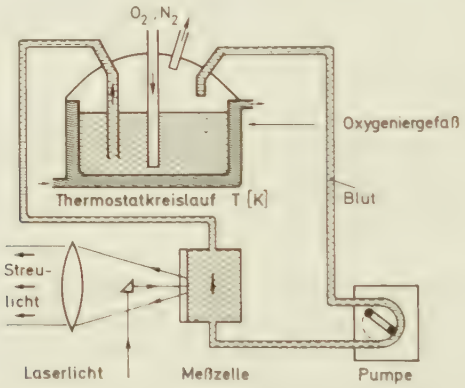


Abb. 26: Prinzip der Streuanordnung zur Resonanz-RAMAN-Streuung in strömendem Blut.
Die Blutprobe wird im Oxygeniergefäß auf konstanter Temperatur gehalten und ständig mit N_2- oder O_2- Gas belüftet.
Die Streugeometrie entspricht einer 180°- Streuanordnung; zur Drehung der Polarisationsrichtung der Laserstrahlung dient ein Polarisationsdreher. Zur Streuanregung werden die Linien eines Argon- und eines Kryptonionenlasers verwendet. Mit Ausnahme des Thermostaten läßt sich die gesamte Meßanordnung im Probenraum des CARY 82 unterbringen.

Die O_2-Diffusion durch den Silikonschlauch der Schlauchpumpe und geringe Gasundichtigkeiten des Kreislaufsystems erforderten eine ständige Gaszufuhr, um einen konstanten Oxygenationsgrad - vor allem im deoxygenierten Zustand - aufrechtzuerhalten. Der direkte Gaskontakt des Blutes schränkt durch die langsame Blutzerstörung die Meßzeit einer Füllung (ca. 100 - 150 ml) auf 4 - 6 Stunden ein. Die Dauer einer Oxygenation des Blutes beträgt ca. 0,5 - 1 Stunde und einer vollständigen Deoxygenation ca. 1,5 - 2,5 Stunden. Durch die Pumpgeschwindigkeit und den Gasdurchsatz lassen sich diese Zeiten variieren. Der Zusatz gesättigter Na_2SO_4- oder K_2SO_4-Lösung als interner Standard für die Untersuchung des Resonanzverhaltens verkürzt die Meßzeit auf 2 - 3 Stunden; danach setzt die Zersetzung der Blutbestandteile und des Hämoglobins in verstärktem Maße ein.

Fluoreszenzverhalten

Die Fluoreszenzintensität wird durch verschiedene Meßparameter, wie die Strömungsgeschwindigkeit, die Bluttemperatur, die Anregungswellenlänge und den Oxygenationsgrad, bestimmt. Abb. 27 gibt die zeitlichen Intensitätsänderungen der Fluoreszenzstrahlung von deoxygeniertem Blut bei 290 K und simulierter pulsativer Strömung wieder. Der Verlauf der Abklingkurve nach dem Ausschalten der Pumpe wird offenbar durch den Einfluß mehrerer Effekte mit unterschiedlichem Zeitverhalten bestimmt, von denen nur die Änderungen mit der Zeitkonstanten $\tau_1 < 1s$ bei einer klinischen Anwendung im arteriellen System einen Einfluß erwarten lassen. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Fluoreszenzintensität ab, gleichzeitig nehmen die statistischen Schwankungen der Gesamtintensität zu.

Der Einfluß der Anregungswellenlänge und des Oxygenationsgrades wird anhand des Absorptionsspektrums in Abb. 25 diskutiert. Ohne Berücksichtigung der Absorption läßt sich

aussagen, daß Unterschiede der Extinktion sowohl für verschiedene Anregungsfrequenzen bei konstantem Oxygenationsgrad als auch für eine konstante Laserwellenlänge und eine

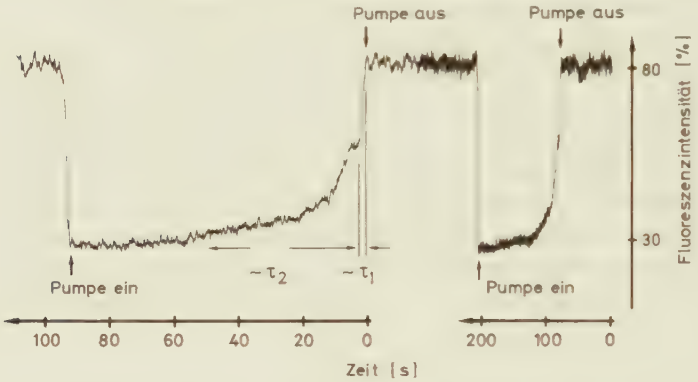


Abb. 27: Zeitliche Intensitätsänderungen der Fluoreszenzstrahlung von deoxygeniertem Blut bei 17°C bei einer durch das Aus- und Einschalten der Pumpe simultierten "pulsativen" Strömung. Für die Trennung der beiden Anteile der Abklingkurve wird die Registrierung um einen Faktor 5 zeitlich gedehnt.

Änderung des Oxygenationsgrades mit Änderungen der Fluoreszenzintensität verbunden sind. Eine Streuanregung im nahezu "isobestischen" Bereich, d.h. im Bereich gleicher Extinktion, von 505-520 nm führt zu konstanten Fluoreszenzintensitäten für beide Hämoglobinformen.

Die Resonanz-RAMAN-Streuung läßt sich nicht nur mit linear polarisiertem, sondern auch mit zirkular polarisiertem Licht anregen, um durch den Umkehrkoeffizienten zusätzliche Informationen zur Bestimmung der Tensorkomponenten zu erhalten. NESTOR, SPIRO (L67) geben für Cytochrom C die registrierten Spektren der beiden linear und der beiden zirkular polarisierten Streulichtkomponenten wieder. Die abgebildeten Spektren zeigen keine Unterschiede im Signal-Rausch-Verhältnis,

die auf wesentliche Unterschiede der Fluoreszenzintensität schließen lassen. Die Streuung von zirkular polarisiertem Licht bietet damit für diese Anwendung keine Vorteile und ist darüberhinaus mit einem größeren Aufwand verbunden.

Identifizierung der RAMAN-Spektren

Die an strömendem Blut gemessenen RAMAN-Spektren gleichen den publizierten Spektren reiner Hämoglobinlösungen; sie unterscheiden sich durch die größere Fluoreszenzintensität

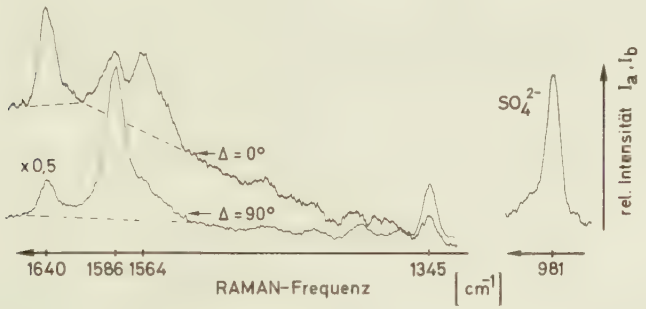


Abb. 28a: Analog registriertes Resonanz-RAMAN-Spektrum einer oxygenierten Blut-Sulfatlösungsmischung bei λ_o= 568,2 nm. Dargestellt sind die polarisierte und die depolarisierte Streulichtkomponente (Registrierverfahren "B") sowie die Schwingungslinie der Sulfatgruppe; s= 10 cm^{-1}.

in Vollblut und durch die größeren Intensitätsschwankungen, die sich auf die Streuung durch die zellulären Bestandteile zurückführen lassen. Um die Gesamtmeßzeit abzukürzen und während des Oxygenationsvorganges Zwischenzustände zu erfassen, wurden die Spektren mit einer Zeitkonstanten von 5 s registriert und anschließend mit Hilfe der rechnerischen Kurvenanalyse ausgewertet. Abb. 28 zeigt einen Vergleich der analog registrierten Spektren mit den digital gespeicherten

Meßkurven, mit den ermittelten Einzellinien und mit den verbleibenden Differenzkurven.

Nach diesem Verfahren lassen sich die Streuspektren des Blutes für verschiedene Anregungsfrequenzen auswerten. Abb. 29 und 30 geben typische Spektren für λ_o = 568,2 nm

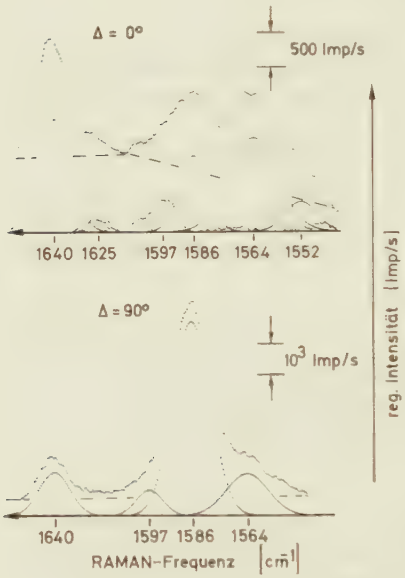


Abb. 28 b:

Kurvenanalyse der Resonanz-RAMAN-Linien im Bereich 1500-1700 cm^{-1} für beide Streulichtkomponenten der Abb. 28a. Abgebildet sind die Näherungskurven und die restlichen Differenzkurven.

(α-Resonanz) wieder; sie zeigen den Einfluß der Oxygenation, die Zunahme des Fluoreszenzuntergrundes und das Auftreten neuer RAMAN-Linien in Abb. 29 sowie die spektralen Unterschiede der polarisierten ($\Delta = 0^o$) und der depolarisierten ($\Delta = 90^o$) Streulichtkomponente. Die Fluoreszenzstrahlung und das gestreute Laserlicht sind polarisiert; die anomal polarisierten Linien weisen dagegen intensive depolarisierte Anteile auf. Beispiele für Streuspektren mit einer Anregung in einem anderen Spektralbereich sind bei der Diskussion der

Bestimmung der Sauerstoffsättigung in Abb. 35-36 wiedergegeben. Die ermittelten RAMAN-Frequenzen stimmen im Rahmen der Meßgenauigkeit $\pm$ 1 cm^{-1} mit den publizierten Frequenzen überein (L38).

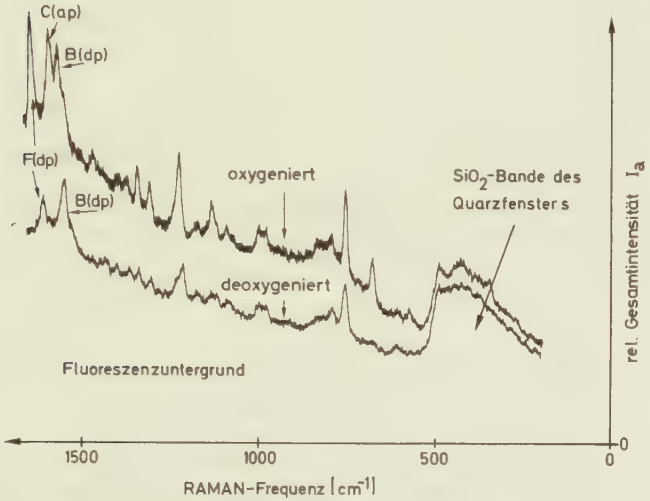


Abb. 29: Resonanz-RAMAN-Spektren von Citratblut bei einer Streuanregung mit λ_0= 568,2 nm. Die beiden Spektren zeigen die Bande der Si-O_2 -Deformationsschwingung und die Unterschiede der Fluoreszenzintensität bei oxygeniertem und deoxygeniertem Blut. Bezeichnung der Linien nach Tab.8, s= 10 cm^{-1}

Als Störspektren können nur die Resonanz-RAMAN-Linien anderer chromophorer Substanzen im Blut auftreten. In Frage kommen

1. Bilirubin, das an Albumin gebunden vorliegt, Normalwert in Serum: 10-20 mg/l,
2. Serumtransferrin mit einer Fe-Konzentration von 1-2 mg/l = 2-4 10^{-5} Mol/l und
3. Cobalamin in geringer Konzentration, wie 0,1-0,4 g/l.

Das Spektrum von Cobalamin weist nur bei 1502 cm^{-1} eine intensive polarisierte Linie auf.

Das Spektrum von Fe(III)-Serumtransferrin ist in der Arbeit von TOMIMATSU et al. (L48) angegeben, Konzentration ca. 10^{-4} Mol/l intensive polarisierte Linien bei 1280 cm^{-1} und bei 1605 cm^{-1}.

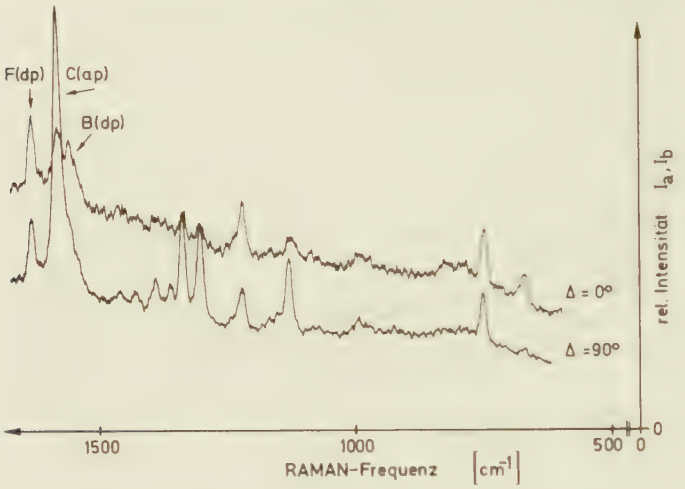


Abb. 30: Depolarisiertes ($\Delta=90^{\circ}$) und polarisiertes ($\Delta=0^{\circ}$) Streulicht der Resonanz-RAMAN-Streuung von oxygeniertem Citratblut; λ_o= 568,2 nm, s= 10 cm^{-1}, Registrierverfahren "B", Fehler bei der Trennung der Streulichtanteile ca. 5%

Das Spektrum für freies Bilirubin in CH_2Cl_2 mit λ_o = 488 nm, 514,5 nm und 530,8 nm in Abb. 31 weist bei 1350 cm^{-1}, 1575 cm^{-1} und 1615 cm^{-1} polarisierte Resonanz-RAMAN-Linien auf, deren Intensität wie beim Transferrin mit zunehmender Laserwellenlänge abnimmt.

Die Resonanz-RAMAN-Linien des Cobalamin lassen wegen der geringen Konzentration und der spektralen Lage keine Störung erwarten. Das Bilirubin- und das Transferrinspektrum weisen nur im blauen und grünen Spektralbereich eine ausreichende Resonanzverstärkung auf, so daß im α-Resonanzbereich die Linien

bei 1575, 1605 und 1615 cm^{-1} verschwinden. Eine störende Überlagerung ist nur bei einer Streuanregung im grünen oder blauen Spektralbereich zwischen den Hämoglobinlinien A(p) oder F(dp) und der Bilirubinlinie bei 1350 cm^{-1} bzw. der Transferrinlinie bei 1605 cm^{-1} zu erwarten.

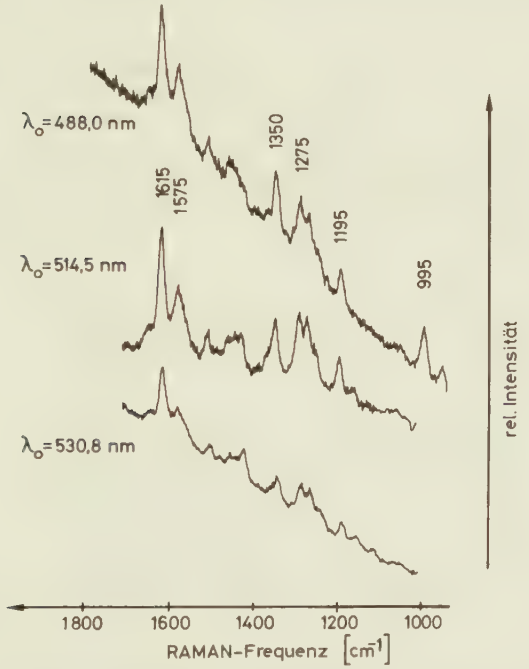


Abb. 31: Resonanz-RAMAN-Spektren von "freiem" Bilirubin in CH_2Cl_2 für die Laserwellenlängen λ_o= 488,0 nm, 514,5 nm und 530,8 nm. Die Resonanzverstärkung nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab; die beobachteten Linien sind entweder polarisiert oder depolarisiert. Zur Messung wird eine rotierende Flüssigkeitsmeßzelle verwendet.

Als Nachweis einer eindeutigen Zuordnung der bei der Streuung in Blut beobachteten Linien zu den Resonanz-RAMAN-Linien des Hämoglobins wird das Resonanzverhalten einiger typischer Linien überprüft. Als interner Standard dient die symmetri-

sche Valenzschwingung der Sulfatgruppe bei 981 cm^{-1} (vgl. Abb. 28a). Für diese Messungen wird das Citratblut mit gesättigter Na_2SO_4-Lösung verdünnt. Abb. 32 - 34 zeigen die Auswertung dieser Messungen am Beispiel des Anregungsprofils einer depolarisierten und einer anomal polarisierten Linie (Abb. 32) sowie des Resonanzverhaltens des Depolarisationsgrades der Linie C(ap) (Abb. 33) bzw. der Linien A(p) und

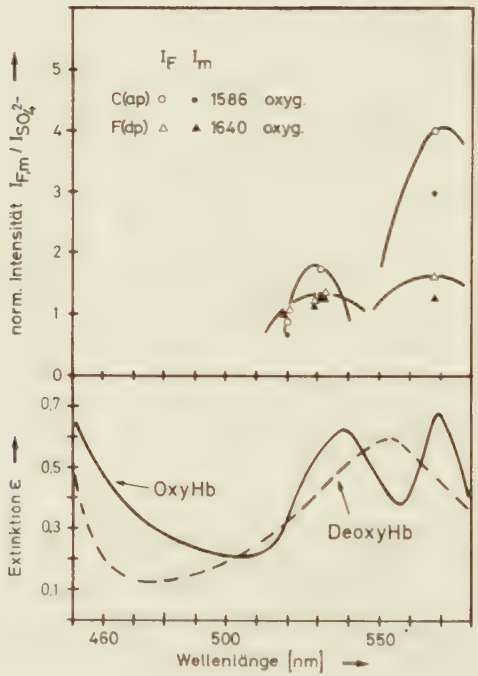


Abb. 32: Anregungsprofil einer depolarisierten und einer anomal polarisierten Linie der oxygenierten Blut-Sulfatlösungsmischung.
Das Absorptionsspektrum im unteren Teil gibt die spektrale Lage der α- und der β-Bande wieder. Im oberen Teil sind die normierten Werte der Maximalintensität I_m und der integrierten Intensität I_F eingetragen; die eingezeichneten Kurven entsprechen dem Resonanzverhalten nach COLLINS et al. (L44).

F(dp) (Abb. 34). Als Bezugskurve für das Resonanzverhalten ist in diesen Abbildungen zusätzlich der spektrale Verlauf der Extinktion angegeben.

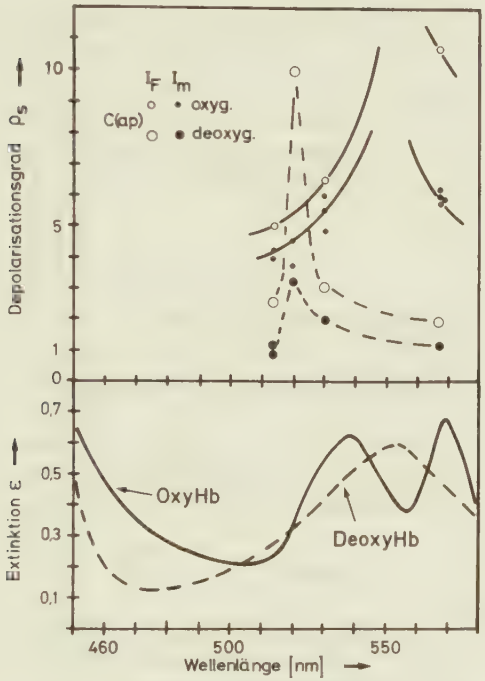


Abb. 33: Resonanzverhalten des Depolarisationsgrades der anomal polarisierten Linie C für die oxygenierte und die deoxygenierte Blut-Sulfatlösungsmischung. Dargestellt ist der Verlauf für die Werte I_m und I_F; s= 10 cm^{-1}.

In den drei Abbildungen sind die Werte der integrierten I_F und der Maximalintensität I_m eingetragen. Die Unterschiede zeigen im Maximum der Resonanz den Einfluß der Halbwertsbreite. Durch die spektrale Lage der Laserlinien lassen sich nur einige Meßpunkte in den verschiedenen Resonanzbereichen

bestimmen; die Intensitätswerte und der Depolarisationsgrad lassen jedoch ein spektrales Verhalten erkennen, das dem der entsprechenden Cytochrom C - Linien entspricht. Das von COLLINS et al. (L43) für Cytochrom C berechnete Resonanzverhalten

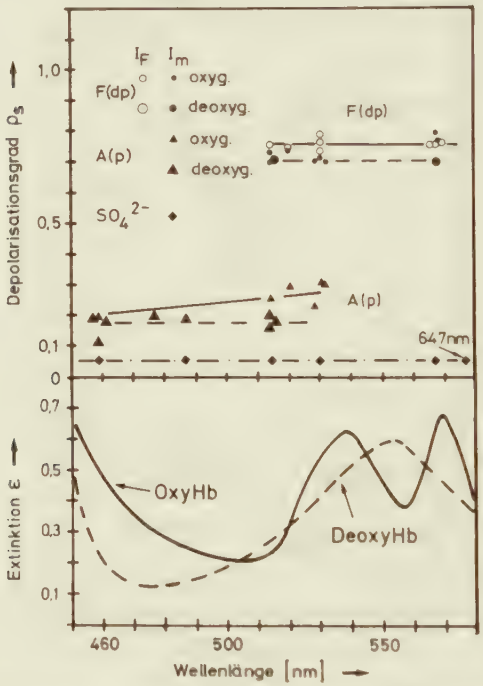


Abb. 34: Resonanzverhalten des Depolarisationsgrades einer polarisierten und einer depolarisierten Linie für eine oxygenierte und eine deoxygenierte Mischung. Zusätzlich ist der konstante Depolarisationsgrad der symmetrischen Valenzschwingungslinie der Sulfatgruppe bei 981 cm^{-1} eintragen.

läßt sich unter Berücksichtigung der geänderten Frequenzwerte qualitativ auf die vorhandenen Meßwerte übertragen. Die eingetragenen Meßwerte verdeutlichen die Streuung der Meßwerte; auf die Angabe einer Standardabweichung wurde

verzichtet, da Abweichungen durch Konzentrationsunterschiede und durch die Zersetzung des Blutes mit Hilfe einer Anpassung aufeinanderfolgender Meßreihen ausgeglichen wurden.

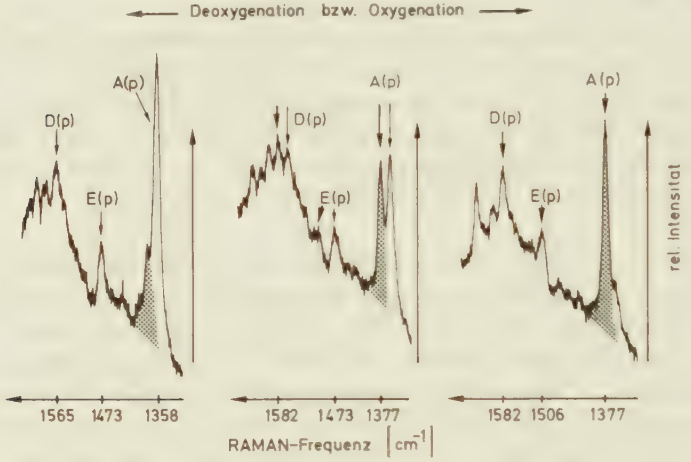
Das Maximum des Depolarisationsgrades der anomal polarisierten Linie wird bei OxyHb wie in (L43) zwischen den beiden elektronischen Übergängen und beim DeoxyHb auf der kurzwelligen Seite des Absorptionsmaximums angenommen. Die polarisierte und die depolarisierte Linie weisen nur einen geringen Einfluß der Anregungswellenlänge auf; zum Vergleich ist der konstante Wert für die Sulfat-Linie eingetragen.

Die quantitative Übereinstimmung der RAMAN-Frequenzen, der Ausschluß der Resonanz-Linien möglicher Störsubstanzen bis auf einen geringen Rest, die Verschiebung charakteristischer Linien bei einer Oxygenation oder Deoxygenation und das qualitativ überprüfte Resonanzverhalten der RAMAN-Linien der Streuung in Blut bestätigen die Annahme, daß es sich bei den beobachteten intensiven Linien tatsächlich um die Resonanz-RAMAN-Linien des Hämoglobins der Erythrozyten handelt.

Bestimmung der Sauerstoffsättigung

BRUNNER, SUSSNER (L36) untersuchten die schrittweise Oxygenation einer verdünnten Hämoglobinlösung; die registrierten Spektren lassen sich bei einer teilweisen Oxygenation durch eine gewichtete Überlagerung der Spektren von OxyHb und von DeoxyHb erklären. Der Gewichtungsfaktor entspricht der Sauerstoffsättigung. Zwischenzustände wurden nicht beobachtet. Die beim Übergang von DeoxyHb zu OxyHb beobachteten Frequenzänderungen (vgl. Tab. 8) betragen auch bei der Streuung in Blut im Mittel ca. 20 cm^{-1}. In jedem der drei Spektralbereiche stehen mehrere Linien zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentrationen zur Verfügung.

Das Verhalten im SORET-Resonanzbereich, d.h. im "blauen" Spektralbereich, zeigen in Abb. 35 die drei Teilspektren im Bereich 1300-1700 cm^{-1} einer Meßreihe von 10 Spektren für



Oxy- bzw. Deoxy-Hämoglobinkonzentrationswerte für I_m von A(p):

OxyHb: 34%	OxyHb: 64%	OxyHb: 91%
DeoxyHb: 66%	DeoxyHb: 36%	DeoxyHb: 9%

Abb. 35: Zusammenstellung von 3 Teilspektren von Zwischenzuständen im Verlauf einer Oxygenation oder einer Deoxygenation einer Citratblutprobe; λ_o= 476,7 nm, SORET-Resonanz, $M \cdot I_o$= 27 mW, unfokussiert, s= 10 cm^{-1}, Fluoreszenz unterdrückt.
Die Pfeile markieren die Lage der 3 intensivsten polarisierten Linien für OxyHb(⟶) und für DeoxyHb(⟶). Die Tabelle gibt die aus der Maximalintensität der Linie A ermittelten Konzentrationswerte wieder.

verschiedene Oxygenationsgrade. Bei der Streuanregung mit λ_o = 477 nm treten nur polarisierte Linien auf; die größte Intensität besitzt die Linie A(p) bei 1377 bzw. 1358 cm^{-1}. Vor allem das mittlere Spektrum läßt deutlich die gewichtete Überlagerung der Spektren beider Hämoglobinformen erkennen. Unter der Annahme einer konstanten Hämoglobingesamtkonzentra-

tion werden aus den Maximalintensitäten der Linien A die Konzentrationsverhältnisse ermittelt; die Rasterung deutet den OxyHb-Anteil an.
Der Nachteil der Streuanregung in diesem Spektralbereich liegt in den starken Fluoreszenzintensitätsänderungen durch die Oxygenation sowie in der Gefahr der Denaturierung des Blutes und der Photodissoziation. Beide Effekte sind nur bei der energiereichen blauen Laserstrahlung, insbesondere bei höheren Strahlungsintensitäten und geringen Strömungsgeschwindigkeiten, zu beobachten.

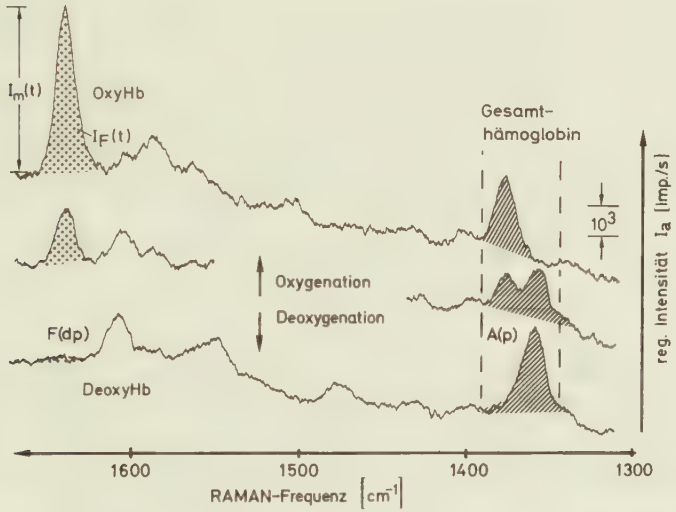


Abb. 36: Zusammenstellung von 3 Einzelspektren von Zwischenzuständen im Verlauf einer Deoxygenation einer Citratblutprobe; λ_o= 514,5 nm, $M \cdot I_o$= 28 mW, unfokussiert, s= 10 cm^{-1}, Änderung der Fluoreszenzintensität durch die Deoxygenation <10%.
Die ausgewerteten Linien A und F sind durch das Raster hervorgehoben; die Intensität der beiden Linien A gibt die Gesamthämoglobinkonzentration an,und die Intensität der Linie F dient zur Bestimmung des OxyHb-Anteils. Der zeitliche Verlauf der Maximalintensität während der Deoxygenation ist in Abb. 37 dargestellt.

Als Beispiel für Messungen im β-Resonanzbereich, d.h. im "grünen" Resonanzbereich, sind in Abb. 36 drei typische Teilspektren im Bereich 1300-1700 cm^{-1} aus einer Meßreihe von 22 Einzelspektren während einer Deoxygenation von ca. 2 Stunden Dauer abgebildet. Die Streuanregung im nahezu isobestischen Bereich (λ_o = 514,5 nm) ergibt einen praktisch konstanten Fluoreszenzuntergrund mit Änderungen <10%. Die übereinander angeordneten Spektren mit unterdrücktem Nullpunkt und Fluoreszenzanteil zeigen anschaulich die Überlagerung der Einzelspektren.

Abb. 37 enthält die Darstellung der Maximalintensitäten der Linien A und der Linie F als Funktion der Deoxygenationszeit t. Die Summe der beiden Maximalwerte der Linien A ist konstant; beim Vergleich der integrierten Intensitäten der Linie A für OxyHb und für DeoxyHb unterscheiden sich die beiden Werte wegen der unterschiedlichen Halbwertsbreite um ca. 10%. Der Quotient der Maximalintensität der Linie F als Meßwert für die OxyHb-Konzentration und der Summe der Intensitäten der Linien A als Meßwert für die Gesamtkonzentration entspricht der Sauerstoffsättigung. Für die Bestimmung der Sauerstoffsättigung als normierte Größe sind damit zwei Meßkanäle mit unterschiedlicher spektraler Bandbreite erforderlich; ein zusätzlicher Meßkanal erlaubt eine Kompensation der Fluoreszenzänderungen, z.B. bei einer pulsativen Strömung. Die Bestimmung als normierte Meßgröße unterdrückt zufällige Schwankungen der Lichtintensität oder der Blutzusammensetzung.

Eine direkte Registrierung der Gesamtintensität einer RAMAN-Linie und des Untergrundes mit nur einem Meßkanal als Funktion der Oxygenationszeit wurde für die Linie C(ap) durchgeführt (Abb. 38). Zusätzlich wurde im α-Resonanzbereich, d.h. im "gelben" Spektralbereich, das Teilspektrum im Bereich 1500-1700 cm^{-1} für beide Streulichtkomponenten vor Beginn und nach Abschluß der zeitlichen Registrierung aufgenommen. Diese Teil-

spektren und der zeitliche Verlauf der Gesamtintensität der depolarisierten Streulichtkomponente ($\Delta = 90^{o}$) sind in Abb. 38 wiedergegeben. Im unteren Teil wurde analog zum direkt registrierten zeitlichen Verlauf der depolarisierten Komponente aus den Anfangs- und Endspektren der Verlauf der polarisierten Intensität rekonstruiert. Die Polarisationseigen-

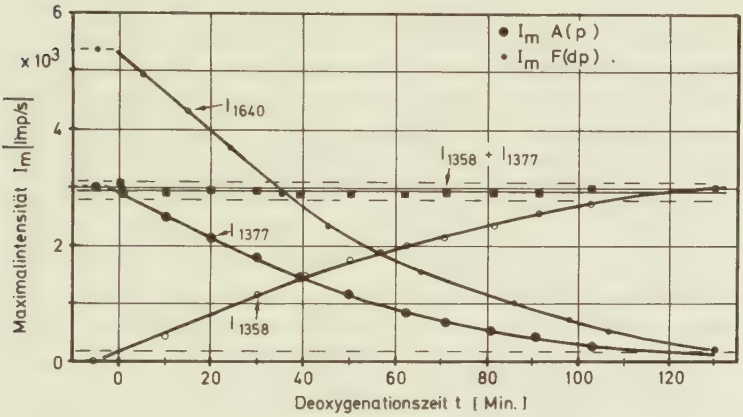


Abb. 37: Auswertung der 22 Teilspektren des Deoxygenationsverlaufs einer Citratblutprobe, Registrierdaten und Wiedergabe von 3 Einzelspektren in Abb. 39.
Dargestellt ist der Momentanwert der Maximalintensität der Linie F (I_{1640}) und der Linie A (I_{1377}) als Maß für die OxyHb-Konzentration und der Linie A (I_{1358}) für die DeoxyHb-Konzentration. Die Summe der beiden Werte der Linien A ist nahezu konstant und stellt ein Maß für die Gesamthämoglobinkonzentration dar.

schaften des Untergrundes und der anomal polarisierten RAMAN-Linie führen bei der Registrierung des depolarisierten Streulichtanteils zu einer weitgehenden Unterdrückung der Fluoreszenzintensitätsänderungen und zu einer Steigerung des Nutzsignal-Untergrundsignal-Verhältnisses.

Die Zuordnung der bei der Streuung in Blut beobachteten Resonanz-RAMAN-Linien zu den Linien des in den Erythrozyten gebundenen Hämoglobins läßt sich eindeutig durchführen. Die Untersuchungen in den drei Bereichen zeigen, daß sich der

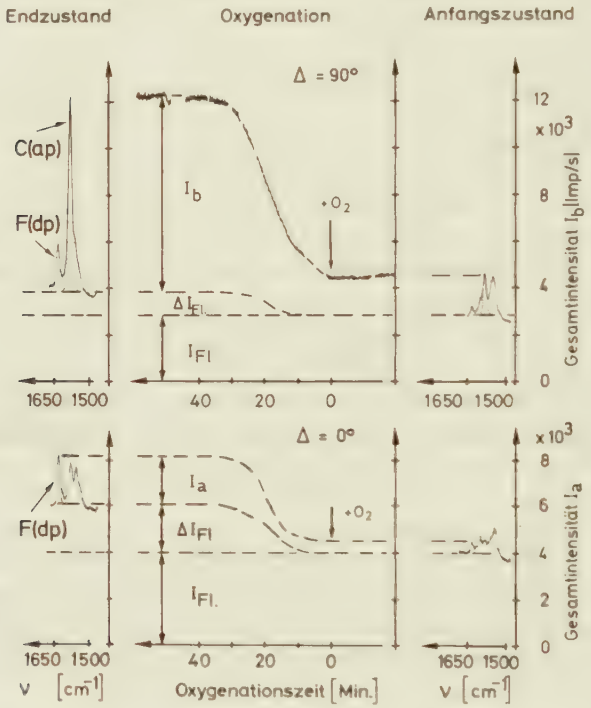


Abb. 38: Direkte Registrierung der zeitlichen Intensitätsänderung im Verlauf einer Oxygenation. Zur Trennung der Fluoreszenzintensitätsanteile dienen die Spektren des Anfangs- und des Endzustandes. Zum Vergleich mit dem registrierten Verlauf der Gesamtintensität der anomal polarisierten Linie C (Δ=90°, depolarisierte Komponente) wird aus den Anfangs- und Endspektren der Intensitätsverlauf der depolarisierten Linie F rekonstruiert.
λ_o= 568,2 nm, M·I_o= 9 mW, fokussiert, α-Resonanz, s= 10 cm^{-1}, Registrierverfahren "B"

"blaue" Spektralbereich wegen der Wirkung der energiereichen Strahlung, wie Koagulation und Photodissoziation auch bei unfokussierter Einstrahlung, sowie wegen starker Unterschiede der Untergrundstrahlung für eine Bestimmung der Sauerstoffsättigung nicht eignet.
Die konstante Extinktion und Fluoreszenzintensität und das Auftreten von drei intensiven Hämoglobinlinien im "grünen" Spektralbereich führen zu einer meßtechnisch besonders interessanten Bestimmung der Sauerstoffsättigung als normierte Meßgröße. Eine Denaturierung wird bei strömendem Blut auch bei Laserintensitäten größer als 100 mW am Probenort nicht beobachtet. Im "gelben" Spektralbereich ermöglicht die Registrierung der depolarisierten Streulichtkomponente allein eine meßtechnische Reduzierung des Untergrundes bzw. eine Erhöhung der Nutzsignalintensität.

Die Berechnung eines "Feasibility Index" erweist sich durch die spezielle Abhängigkeit der Intensität von der Anregungsfrequenz als schwierig; für den "grünen" und "gelben" Spektralbereich läßt sich ein mittlerer Wert $X \approx 10^{-14}$ angeben. Die Fluoreszenz- und die RAMAN-Intensität erreichen bei der Streuung in Vollblut die gleiche Größenordnung.

Neben der Anwendung der Resonanz-RAMAN-Streuung zur Sauerstoffsättigungsbestimmung sind weitere klinische Anwendungen in Form von in vitro Untersuchungen möglich, wie z.B. zur Bestimmung des Bilirubingehaltes im Harn (pathologisch) oder in der Gallenflüssigkeit. Für eine Anwendung bei immunologischen Untersuchungen wird auf die Arbeiten von CAREY et al. verwiesen, die in (L62) die Streuung an Proteinen mit chromophoren Liganden am Beispiel des Serumalbumins mit Methylorange und in (L7) die Untersuchung der Hapten-Antikörper-Wechselwirkung beschreiben.

5.3 RAMAN-spektroskopische Gasanalyse

Für RAMAN-spektroskopische Gasanalysen lassen sich zwei Spektrentypen, die reinen Rotations-RAMAN-Spektren und die Schwingungs-RAMAN-Spektren mit überlagerter Rotationsstruktur, verwenden, deren Registrierung sich durch die erforderliche spektrale Bandbreite unterscheidet. Dies führte zu getrennten Untersuchungen des Streuverhaltens; die Beschreibung der Meßanordnung sowie die Diskussion der Meßgenauigkeit und des "Feasibility Index" erfolgen für beide Spektrentypen gemeinsam.

Durch den einfachen Aufbau der Moleküle der niedermolekularen Gase und durch das Fehlen einer starken Wechselwirkung lassen sich die Spektren und die Intensitäten der einzelnen RAMAN-Linien aus den Moleküleigenschaften berechnen, und umgekehrt können aus den Schwingungs- und Rotationsspektren die Molekülparameter experimentell ermittelt werden. Über diese theoretischen und experimentellen Untersuchungen liegt eine umfangreiche Literatur vor, als Beispiel für die quantenmechanische Berechnung der Spektren einfacher Gase wird auf PLACZEK, TELLER (L49) verwiesen. HERZBERG (L50) gibt neben einer Beschreibung der Spektren eine Zusammenstellung der spektralen Daten für verschiedene Gase wieder. Die Rotationskonstanten, die Schwingungsfrequenzen und die Streuquerschnitte sind für die Mehrzahl der Gase der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen bekannt. Die geringe optische Dichte der Gase ermöglicht den Einsatz einer Multipass-Anordnung zur Erhöhung der effektiven Laserleistung bei der Streuanregung, indem das ungestreut aus der Gasprobe austretende Laserlicht durch zwei Hohlspiegel erfaßt und wieder in die Gasprobe reflektiert wird. Eine weitere Steigerung des Multipassfaktors läßt sich durch eine Streuung im Laserresonator erzielen; WEBER et al. (L51) geben eine Zusammenstellung der verschiedenen Streuanordnungen und der Multipassfaktoren.

Abb. 39 zeigt schematisch den Strahlengang der Multipass-Anordnung mit der Durchflußgasküvette, die zwei Anschlüsse für eine Vakuumpumpe und für den Testgasbehälter aufweist.

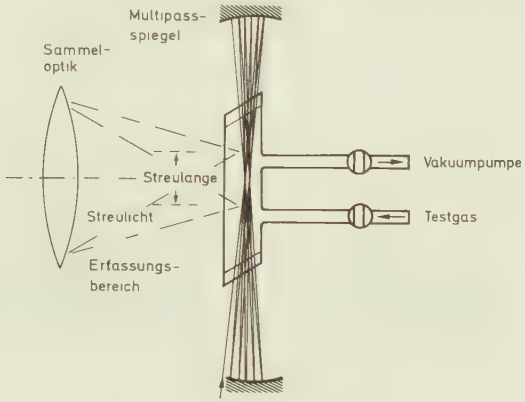


Abb. 39: Prinzip der Meßanordnung zur RAMAN-Streuung in Gasen mit der festeingebauten Durchflußgasküvette, die durch die getrennten Anschlüsse der Vakuumpumpe und der Testgasbehälter eine Evakuierung der gesamten Fülleinrichtung ermöglicht.

Die "Streulänge" entspricht der Höhe des Spaltbildes in der Streuebene. Bei der Auswertung der Rotationsspektren ist der Flächenfaktor G zu berücksichtigen. Die Bedeutung des Multipassfaktors M wird auf die Beschreibung der Gesamtverluste und die Intensitätssteigerung des Beleuchtungsstrahlenganges ausgedehnt.

Die Reproduzierbarkeit der Intensitätsmessungen wird durch mehrere Störungen beeinträchtigt, von denen sich die Empfindlichkeitsschwankungen der Referenzfotodiode und der Einfluß der instabilen Halterung der Originalküvette einfach beseitigen ließen. Für den verbleibenden Störeinfluß auf die spektrale Nachweisempfindlichkeit kommt die selbsttätige Dejustierung der mechanisch instabilen Multipassanordnung als wahr-

scheinlichste Ursache in Frage; der an sich geringe Effekt wird durch die Mehrfachreflexion verstärkt. Die Kompensation der Gesamtdrift des Spektrometers erfolgte durch alternierende Eichmessungen mit Luft.

Analyse der Rotations-RAMAN-Spektren

Die Struktur der registrierten Spektren läßt sich für die linearen Moleküle O_2, N_2, N_2O und CO_2 durch die Näherung des starren Rotators beschreiben (vgl. (L8), (L50)). Der Einfluß der Zentrifugalverzerrung, durch die Zentrifugalkonstante D beschrieben, ist nur bei einer interferometrischen Registrierung zu beobachten und wird bei der Registrierung mit dem Spektrometer CARY 82 vernachlässigt. Für die Beschreibung der Rotationszustände T_J im Termschema (vgl. Abb. 1) mit der Rotationsquantenzahl J gilt für den nicht starren Rotator:

$$T_J = \underbrace{B \cdot J \cdot (J+1)}_{\text{starrer Rotator}} - \underbrace{D \cdot J^2 \cdot (J+1)^2}_{\text{Einfluß der Zentrifugalkräfte}} + \ldots \quad [cm^{-1}]$$

Daraus läßt sich der Abstand der Rotationslinien von der RAYLEIGH-Linie im STOKESschen S-Zweig des Schwingungsgrundzustandes (v = 0) ableiten. In der Näherung des starren Rotators (D = 0) gilt:

$$\nu_{Rot.} = 6 B_o + 4 B_o \cdot J - \ldots \quad [cm^{-1}]$$

Die Symmetrieeigenschaften der Rotationsterme und der Einfluß der Kernspinstatistik ergeben statistische Gewichtungsfaktoren für die einzelnen Rotationsübergänge, die in den Spektren des O_2 und des CO_2 das Fehlen jeder zweiten Linie und im N_2-Spektrum das Alternieren der Linienintensitäten verursachen.

Abb. 40 enthält eine Zusammenstellung der Rotationsspektren der reinen Gase mit der Angabe des mittleren Abstandes der Rotationslinien. Die ermittelten Werte der Rotationskonstanten stimmen im Rahmen der Meßgenauigkeit mit den Literaturwerten (L11), (L12) überein; z.B. beträgt der Meßwert für O_2 B_o = 1,44(5) cm^{-1} und der Wert nach (L12) B_o = 1,4378 cm^{-1}. Der theoretische Kurvenverlauf der Einhüllenden der Rotations-

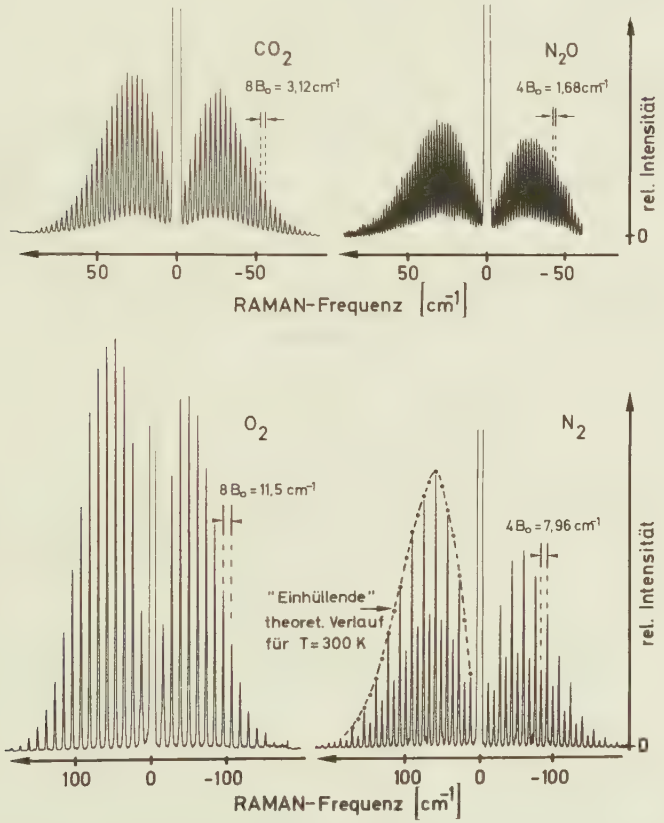


Abb. 40: Zusammenstellung der Rotations-RAMAN-Spektren der reinen Gase mit der Angabe des Abstandes der Rotationslinien; λ_o = 488 nm, s = 2 cm^{-1} für O_2 und N_2, s = 1 cm^{-1} für CO_2 und s = 0,5 cm^{-1} für N_2O

linien (L49) läßt sich zum Erkennen systematischer Fehler bei der Registrierung benutzen. Die spektrale Trennung der Rotationslinien im Spektrum von N_2O erfordert eine spektrale Bandbreite $s \leq 0{,}5\ cm^{-1}$, mit der die Auflösungsgrenze des CARY 82 erreicht wird. Dies bedeutet, daß eine vollständige Analyse von Mischungsspektren nicht möglich ist.

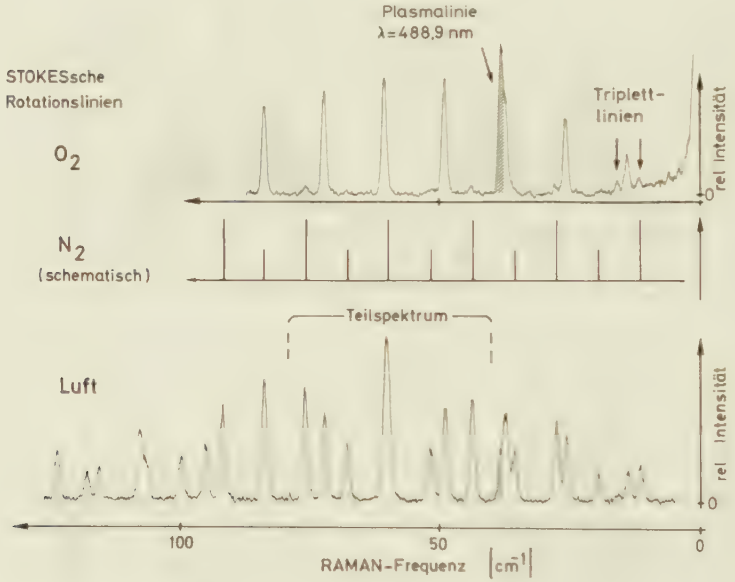


Abb. 41: Vergleich eines Teilbereichs des O_2-Spektrums und der Lage der N_2-Linien mit dem Rotations-RAMAN-Spektrum einer Luftprobe; $\lambda_o = 488{,}0$ nm. Die Intensität der Linie mit $\lambda = 488{,}9$ nm hängt vom Typ des Laserspiegels und der Justierung des Vormonochromators ab. Die Triplettlinien des O_2 kennzeichnen die erreichte Auflösung.

Eine vollständige Trennung der überlagerten Rotationslinien erfordert wieder eine rechnerische Kurvenanalyse, bei der die spektrale Lage und das apparative Linienprofil vorgegeben sind. Nach der Trennung in die gasspezifischen Einzelspektren lassen

sich die einzelnen Intensitätswerte und daraus die Konzentrationsverhältnisse ermitteln. Durch die geringe Kernspeicherkapazität des verwendeten Rechners (vgl. S. 56) und durch die geringe Reproduzierbarkeit der absoluten Intensitätswerte der Rotationsspektren besitzt die rechnerische Kurvenanalyse für diese Untersuchungen keine praktische Bedeutung.

Qualitativ läßt sich dieses Verfahren für die registrierten Spektren grafisch durchführen. Abb. 41 zeigt die Zuordnung der Rotationslinien des O_2-(Meßkurve) und des N_2-Spektrums (schematisch) zu den überlagerten Linien im Spektrum von Luft. Die registrierten Spektren enthalten zwei Besonderheiten: die nicht vom Vormonochromator abgetrennte schwache Laserlinie des Ar^+-Lasers bei $\lambda = 488{,}9$ nm (vgl. HICKMAN, LIANG (L52)) und die spektral aufgelösten Triplettbanden des O_2 als Satelliten der ersten Rotationslinie des O_2, die die erreichte Auflösung kennzeichnen. Der in Abb. 41 markierte Spektralbereich wird in Abb. 42 als Teilspektrum für die Zuordnung einzelner CO_2-Linien verwendet. Die mit unterschiedlicher Spektrometerempfindlichkeit registrierten Teilspektren der N_2+O_2+CO_2-Mischung, von reinem CO_2 und von Luft zeigen die starke Überlagerung der einzelnen Rotationslinien, von denen sich grafisch nur die beiden durch die Rasterung hervorgehobenen CO_2-Linien eindeutig identifizieren lassen. Dieses Beispiel unterstreicht die Schwierigkeiten einer Gasanalyse anhand der Rotationsspektren, die sich bei der Analyse von exspiratorischen Narkosegasen durch die Überlagerung von N_2O und CO_2 noch verstärken, wenn zur spektralen Trennung des Streulichts ein Gittermonochromatorsystem eingesetzt wird.

Zwar reicht die spektrale Auflösung des CARY 82 für eine vollständige Trennung der Rotationslinien von Gasmischungen nicht aus, aber der Vergleich des Feasibility Index für die Analyse der Rotationsspektren mit dem Wert für die Schwingungsspektren läßt sich anhand der Spektren der reinen Gase durchführen. Die für die Berechnung des X-Wertes benötigten Beziehungen und

Daten sind für den Streuquerschnitt der intensivsten STOKES-schen Rotationslinie in Tab. 9 angegeben. Setzt man für den

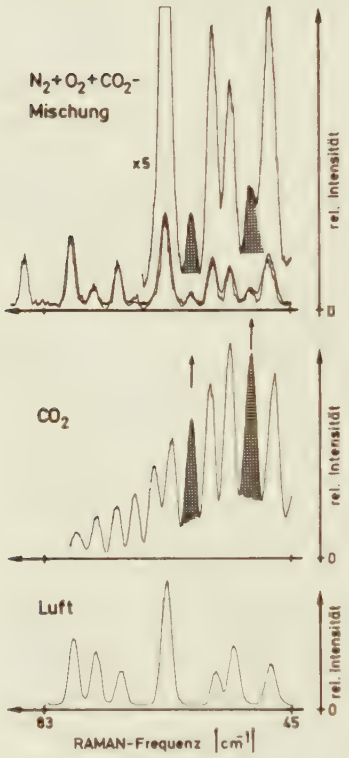


Abb. 42:

Zusammenstellung der Teilspektren von Luft (unten), reinem CO_2 (Mitte) und einer N_2+O_2+CO_2-Mischung (oben). Auch mit einer vergrößerten Empfindlichkeit des Spektrometers lassen sich nur die hervorgehobenen CO_2-Linien im Mischungsspektrum identifizieren.

Multipassfaktor M = 2 an und vernachlässigt den Flächenfaktor G, so ergibt sich für den Feasibility Index ein berechneter Wert von ca. $5 \cdot 10^{-15}$ für N_2 bzw. O_2; die gemessenen Werte liegen im Bereich von 10^{-16}-10^{-15}. Ein Teil der Differenz läßt sich durch den geometrisch bestimmten Flächenfaktor $G \lesssim 0{,}1$ erklären, hinzu kommen Verluste durch das Auffächern der

mehrfachreflektierten Laserstrahlen im Streuzentrum.

Tab. 9 - nach Angaben von (L11) und (L12) - enthält die für die Bestimmung der X-Werte verwendeten Streuquerschnitte "$(\sigma_{zz})_{J\to J'}$" der polarisierten Streulichtkomponente sowie das Verhältnis $R_{J\to J'}$ der Gesamtintensität der intensivsten

$$(\sigma_{zz})_{Vib.} = 5{,}5\cdot 10^{-31}\ \left[cm^2/sr\right] \quad \text{für } \lambda_o = 488\ nm \text{ (L12)}$$

$$R_{J\to J'} = \frac{7}{4}\cdot F_J\cdot(\sigma_{zz})_{J\to J'}/(\sigma_{zz})_{Vib.} \triangleq (5) \qquad \text{(L12)}$$

$$\sum_J(\sigma_{J\to J'}\cdot F_J) = (\sigma_{\Sigma Rot.})/(\sigma_{Vib})\ (\sigma_{zz})_{Vib.} \triangleq (7)$$

Gas	J→J'	F_J	$(\sigma_{zz})_{J\to J'}$ $[10^{-30}\ cm^2/sr]$ (L12)	$R_{J\to J'}$ (L12) ⑤	(L11)	$\frac{\sigma_{\Sigma Rot}}{\sigma_{Vib.}}$ (L11) ⑥	⑦ $[10^{-29}\ cm^2/sr]$	⑦/⑤
N_2	6 8	0,11	5,4	1,92	1,9	30	1,65	15,8
O_2	7 9	0,14	14	5,3	4,0	50	3,5	12,5
CO_2	16 18	0,074	53	8,4	6,9	175	14	25,4

Tab. 9 : Zusammenstellung der Literaturwerte verschiedener Kombinationen des differentiellen Streuquerschnitts einer einzelnen Rotationslinie, aller Rotationslinien und der relativen Größen, bezogen auf den Wert der Schwingungslinie bzw. auf den Wert einer Rotationslinie nach Literaturangaben.

Rotationslinie zur Intensität des Q-Zweigs der Schwingungslinie (Index Vib.). Der absolute Streuquerschnitt für die Bestimmung der Gesamtintensität aller Rotationslinien wird aus den angegebenen Beziehungen ermittelt. Die Zahlenwerte $(\sigma_{\Sigma Rot.}/\sigma_{Vib})$ in Spalte ⑥ geben die Streuausbeute bei der Erfassung aller Rotationslinien relativ zur Registrierung der Schwingungslinie an. Für einen direkten Vergleich der Registrierung einer intensiven Rotationslinie und der Erfas-

sung aller Linien müssen die oben angegebenen Werte durch $R_{J \to J'}$ dividiert werden. Der Intensitätsgewinn beträgt ca. 10-20, dazu ist jedoch eine Registrierung mit einem anderen Spektralapparat erforderlich.

Die kennzeichnende Eigenschaft der Rotationsspektren ist die periodische Zunahme der RAMAN-Frequenzen aufeinanderfolgender Linien. Ein FABRY-PEROT- Interferometer in einer speziellen Betriebsart ist diesem periodischen Aufbau der Spektren angepaßt. Für die Diskussion dieses Registrierverfahrens zur RAMANspektroskopischen Gasanalyse liegen verschiedene Arbeiten vor, z.B. PENNY, LAPP (L2), BARRETT, MYERS (L53) und SMITH (L54). Durch den Einsatz des Interferometers ohne eine Vorzerlegung des Streulichts und durch Ausblendung eines einzelnen räumlichen Transmissionsbereichs, vorzugsweise des zentralen "Rings" enthält das durchgelassene Licht die Frequenzen ν_k verschiedener Interferenzordnungen k. Maximale Transmission tritt für die folgenden Frequenzwerte auf:

$$\nu_k = \frac{k}{2\mu \cdot d \cdot \cos\theta}$$

k ganze Zahl
μ Brechungsindex
d Plattenabstand [cm]
θ Transmissionswinkel

Bei konstantem μ, d und θ lassen sich die Frequenzwerte, für die die Transmissionsbedingung in dem ausgewählten räumlichen Transmissionsbereich erfüllt ist, durch eine periodische δ-Funktion beschreiben. Das Bild der aufeinanderfolgenden Transmissionsbereiche in der Frequenzdarstellung führte zu der Bezeichnung "Kammfilter" für diese Betriebsart des FABRY-PEROT-Interferometers. Abb. 43 veranschaulicht die spektrale Lage der Rotationslinien und der Transmissionsfrequenzen. Bei einer Registrierung des Lichts des zentralen "Rings" läßt sich das Interferometer durch die Variation von μ oder d auf den gasspezifischen Abstand der Rotationslinien abstimmen.

Durch den größeren Transmissionsgrad, der ideale Wert beträgt

ca. 50-60%, durch den großen Raumwinkel sowie durch die gleichzeitige Erfassung aller Rotationslinien ergibt sich gegenüber der Registrierung mit einem Gittermonochromator ein größerer Feasibility Index. Der Steigerungsfaktor beträgt

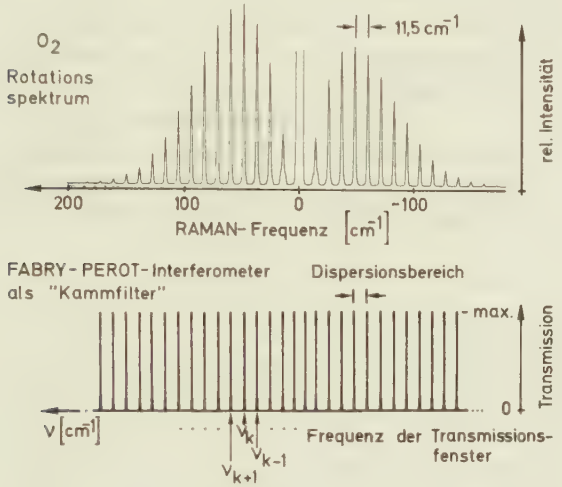


Abb. 43: Vergleich der spektralen Lage der Rotationslinien von O_2 und den Transmissionsbereichen eines FABRY-PEROT-Interferometers in einer speziellen Betriebsart, dessen Dispersionsbereich auf den Abstand der Rotationslinien abgestimmt wurde. Dabei trifft die RAYLEIGH-Strahlung auf ein Minimum der Transmission.

nach (L53) ca. 10^4 bzw. nach (L54) 10^3-10^4. Die Abweichungen von der streng periodischen Struktur der Spektren eines starren Rotators durch die Zentrifugalverzerrung sind bei den bisher untersuchten Gasen gering (L53); die gemessenen Intensitätsverhältnisse der Rotationslinien und der RAYLEIGH-Linie erreichen nahezu den theoretischen Wert.

Bei der Analyse von Gasmischungen können durch diese interferometrische Registrierung Störungen auftreten, wenn bei der

Abstimmung auf die Rotationsfrequenzen der einen Mischungskomponente zufällig ein Transmissionsfenster eine Rotationslinie eines anderen Gases erfaßt. Nach SMITH (L54) ist für gleiche Intensitäten des Störsignals, d.h. einer zufällig erfaßten Linie eines Fremdgases, und des Nutzsignals, d.h. der Linien des Testgases, mindestens ein Konzentrationsverhältnis des Fremdgases zum Testgas von $1 : 10^{-4}$ erforderlich. Für Atemgasanalysen mit einem N_2- zu CO_2-Konzentrationsverhältnis von $1 : 10^{-2}$ sind daraus keine Störungen zu erwarten. Für eine klinische Anwendung erfüllt dieses Verfahren jedoch nicht die Forderung der Simultanregistrierung und ist darüberhinaus mit einem beträchtlichen technischen Aufwand verbunden.

Analyse der Schwingungs-RAMAN-Spektren

Die Schwingungsspektren der niedermolekularen Gase bestehen aus einzelnen Schwingungslinien, die sich in drei Zweige von Rotationslinien auflösen lassen. Der Abstand der Rotationslinien des S- und des O-Zweiges entspricht näherungsweise dem Abstand der reinen Rotationslinien; der Abstand der Rotationslinien des Q-Zweigs ist um mehr als eine Größenordnung kleiner und mit der spektralen Auflösung des Spektrometers CARY 82 nicht mehr zu ermitteln. Die Gesamtintensität des S- und O-Zweigs zusammen beträgt ca. 10% der Intensität des Q-Zweigs; üblicherweise wird der Streuquerschnitt, wie in Tab. 9, für den Q-Zweig allein angegeben.

Die Schwingungsfrequenzen lassen sich näherungsweise als harmonische Oszillationen berechnen, beim Auftreten von Ober- oder Differenzschwingungen ist der Übergang zur Näherung des anharmonischen Oszillators notwendig. Zusätzliche Unterschiede zwischen beobachteten und berechneten Frequenzwerten treten bei CO_2 und N_2O durch die FERMI-Resonanz auf. Eine ausführliche Beschreibung der Rotationsschwingungsspektren der wichtigsten Gase und eine Zusammenstellung der Molekülparameter ist

bei HERZBERG (L50) gegeben.
Abb. 44 enthält eine grafische Zusammenstellung der RAMAN-Frequenzen verschiedener niedermolekularer Gase; N_2, O_2 und H_2O weisen eine, CO_2 zwei und N_2O drei intensive Schwingungslinien für T = 300K auf.

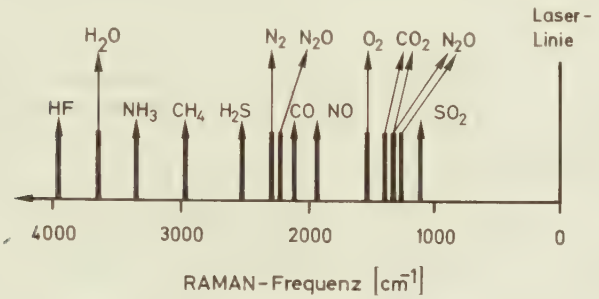


Abb. 44: Schematische Darstellung der Lage der intensiven Schwingungslinien verschiedener Gase im RAMAN-Spektrum. Die obere Reihe enthält die in dieser Arbeit untersuchten Gase von medizinischer Bedeutung.

Die charakteristischen Eigenschaften lassen sich anhand des Übersichtsspektrums einer Laborluftprobe, die Messung wurde ohne Gasküvette durchgeführt, in Abb. 45 erläutern. Die Registrierung erfolgte mit großer Spektrometerempfindlichkeit und einer spektralen Bandbreite s = 10 cm^{-1}. Die Rotationslinien sind nicht getrennt und werden zusätzlich durch die Flanke der RAYLEIGH-Linie überlagert. Die Maximalintensitäten der N_2- und der O_2-Linie überschreiten den Registrierbereich; eine der CO_2-Linien, für eine Gaskonzentration $<0{,}1$ %, läßt sich bei der erhöhten Spektrometerempfindlichkeit erkennen, die zweite Linie wird durch den O-Zweig der O_2-Linie überlagert. Die Fremdlichtbande im Rotationsflügel der N_2-Bande läßt sich der Hg-Spektrallinie mit λ = 546,1 nm der Leuchtstoffröhren der Raumbeleuchtung zuordnen; bei Messungen mit einer großen Spektrometerempfindlichkeit wurde deshalb die Raumbeleuchtung abgeschaltet. Die C-H-Valenzschwingungslinien und die Fluoreszenz sind unüblich und lassen sich auf eine

Verunreinigung des Spektrometers mit Toluol aus einer vorhergehenden Untersuchung zurückführen. Die Wasserdampfkonzentration kann bei hoher Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit Werte bis 2 % erreichen; im Normalfall lag der Wert unter 0,5 %.

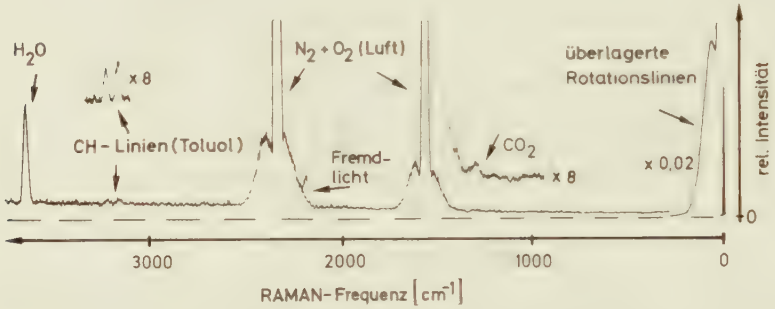


Abb. 45: Übersichts-RAMAN-Spektrum einer Laborluftprobe, Registrierung ohne Gasküvette. Die C-H-Schwingungslinien und die Fluoreszenz rühren von einer Verunreinigung des Spektrometers mit Toluol bei einer vorhergegangen Messung her. Das Fremdlicht der Hg-Spektrallinie bei λ= 546,1 nm stammt von den Leuchtstoffröhren der Raumbeleuchtung.

Typische Schwingungsspektren von Gasmischungen bei einer Messung mit der Durchflußküvette und einer spektralen Bandbreite s = 30 cm^{-1} sind in Abb. 46 wiedergegeben. Das Spektrum der Luft +CO_2-Mischung enthält die Schwingungslinien von CO_2, N_2,O_2 und H_2O. Der Fluoreszenzuntergrund und die überlagerten RAMAN-Banden bei 400 cm^{-1} sind durch das Wandmaterial der Gasküvette bedingt. Das Spektrum einer typischen Narkosegasmischung ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Der Vergleich der beiden Spektren läßt für exspiratorische Narkosegase eine Überlagerung je einer Linie von N_2O und CO_2 erwarten. Zur ungestörten Konzentrationsbestimmung stehen jedoch neben der "Summenlinie" mehrere nichtüberlagerte Schwingungslinien zur Verfügung.

Die RAMAN-Frequenzen und die relativen Werte der Streuquerschnitte, die auf den Wert für N_2 bezogen werden, sind in Tab. 10 zusammengefaßt. Der differentielle Streuquerschnitt wird mit σ abgekürzt; eingetragen sind sowohl die gemessenen Werte als auch Vergleichswerte aus der Literatur. Der Meß-

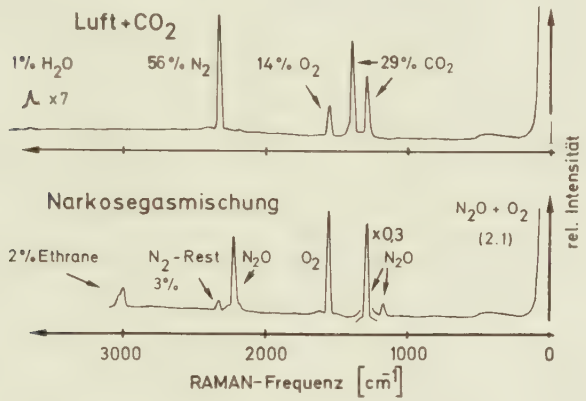


Abb. 46: Schwingungs-RAMAN-Spektren einer Luft-CO_2-Mischung und einer typischen Narkosegasmischung. Der Untergrund zeigt eine Bande des Küvettenmaterials. Die Konzentrationswerte wurden durch einen Vergleich der Maximalintensitätswerte mit denen verschiedener Eichspektren ermittelt; λ_o= 488 nm, s= 30 cm^{-1}.

fehler läßt sich für Ethran und Halothan nicht angeben, da die Genauigkeit der Mischungszusammensetzung wegen der Abfüllung aus verschiedenen Narkosegeräten nicht bekannt ist. Abb. 47 zeigt das Teilspektrum des Valenzschwingungsbereichs der CH-Gruppe beider Narkosemittel; beim Ethran liegen zwei CH-Bindungen vor, deren Schwingungen zu einer Doppelbande führen. Die RAMAN-Frequenzen des vollständigen Spektrums von Halothandampf sind bei HORNISCHER, MOSER (L58) angegeben; die CH-Valenzschwingungen führen ähnlich wie beim Äthanoldampf zu intensiven Schwingungslinien.

Der Feasibility Index läßt sich aus den Spektrometerdaten, der optischen Nachweisempfindlichkeit (s. Abb. 11), M = 2 und G = 1 berechnen. Für eine Gaskonzentration von 100 Vol.%

Gas	RAMAN-Frequenz	relative Streuquerschnitte: Literaturwert a	b	Autor a	b	σ / σ_{N_2}	σ_1/σ_2
N_2	2330	1,0		(L56)		1,0	
O_2	1556	1,2	1,3	"	(L11)	1,25(8)	
CO_2	1286	1,0	0,9	"	"	1,0(1)	$\sigma_{1388}/\sigma_{1286} = 1,5$
	1388	1,5	1,4	"	"	1,5(1)	$\sigma_{eff.} = 2,5$
N_2O	1167	-	-			0,10(3)	$\sigma_{1167}/\sigma_{1285} = 0,05$
	1285	2,7	2,2	(L57)	"	2,3(2)	$\sigma_{2224}/\sigma_{1285} = 0,22$
	2224	0,53	0,51	"	"	0,50(5)	$\sigma_{eff.} = 2,9$
Halothan	3018	-	-			2,8	
Ethran	3004/3033	-	-			6	Doppelbande
H_2O	3652	2,5		(L58)		2,9(5)	

Tab. 10: Literatur- und Meßwerte des relativen Streuquerschnitts der Schwingungslinien der Atem- und Narkosegasmischungskomponenten für $\lambda_o = 488$ nm. Der differentielle Streuquerschnitt wird mit σ abgekürzt.

N_2 oder O_2 und eine spektrale Bandbreite s = 30 cm^{-1} beträgt X ca.10^{-14}. Die berechneten Werte stimmen mit dem aus den registrierten Impulsraten ermittelten Index besser überein als bei den Rotationsspektren. Der experimentelle X-Wert erreicht im Mittel 80 % des berechneten Wertes; die Abweichungen lassen sich durch den Einfluß der mechanischen Instabilität der Multipassanordnung sowie durch die Meßungenauigkeit der Laserintensität und des Multipassfaktors M erklären.

Zur Eichung des Spektrometers und zur Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit dienten neben reinen Gasen eine Reihe verschiedener Testgasmischungen definierter Zusammensetzung*. Die

*PLASTIGAS der Fa. LINDE AG, die Mischungsgenauigkeit wird mit 2% der geringer konzentrierten Komponente angegeben.

Mischungen bestanden aus O_2in N_2 sowie aus CO_2 in N_2 oder Luft, wobei O_2 bzw. CO_2 in Konzentrationen von 1, 2, 5 oder 10 Vol.% vorlagen. Zur Veranschaulichung der Meßabweichungen

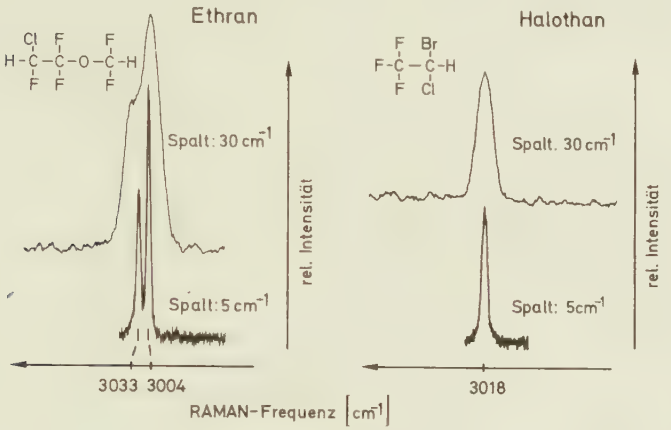


Abb. 47: Teilspektrum des C-H-Schwingungsbereichs der beiden Narkosemittel Ethran und Halothan. Zur Auflösung der Doppellinie des Ethrans dient die zusätzliche Registrierung mit s= 5 cm^{-1}; λ_o= 488 nm.

einer RAMAN-spektroskopischen Analyse dieser Gasmischungen wird in Abb. 48 der Quotient des Konzentrations-Istwertes und des -Sollwertes als Funktion der Testgaskonzentration dargestellt. Die Fehlerbreite ergibt sich aus den Intensitätsschwankungen und aus den systematischen Fehlern durch die Überlagerung und mangelnde spektrale Auflösung.

Für die Schwingungsspektren ergibt sich im Vergleich dazu wegen der fehlenden Überlagerung und der größeren registrierten Impulsraten eine größere Meßgenauigkeit. Typische Impulsraten der Schwingungslinien sind $6\text{-}8\cdot10^4$ Imp/s gegenüber $0{,}5\text{-}2{,}0\cdot10^3$ Imp/s bei den Rotationsspektren für eine Gaskonzentration von 100 Vol.% und I_o = 1 W. Die Nachweisgrenze ist kleiner als 0,2-0,5 Vol.% und bezieht sich auf die Regi-

strierbedingungen: λ_o = 488 nm, Laserintensität am Probenort MI_o = 400 mW, M = 2,5, Signal-Rausch-Verhältnis 5 und Registrierzeitkonstante 5 s. Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und registrierter Intensität wurden im Bereich von 0,5 - 100 Vol.% in Übereinstimmung

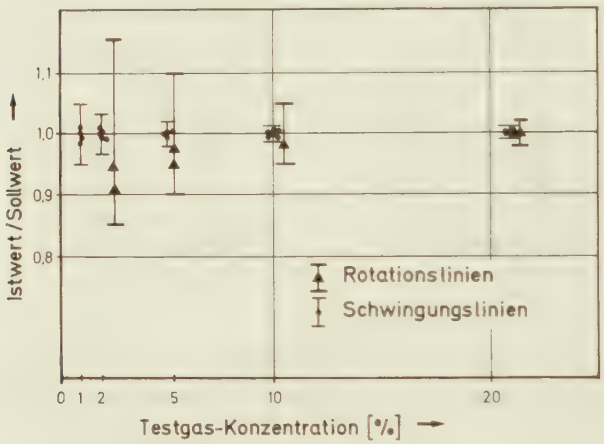


Abb. 48: Istwert/Sollwert-Verhältnis der Konzentrationswerte als Funktion der Testgaskonzentration. Verwendet wurden Eichgasmischungen und Luft; die Fehlerbalken geben die Summe der statistischen und systematischen Fehler wieder. Die Überlagerung der Rotationslinien und die zu geringe spektrale Auflösung des CARY 82 ergibt bei der Analyse der Rotationsspektren zu kleine Konzentrationswerte.

mit den Untersuchungen von KARGER et al. (L32) nicht beobachtet. Eine Steigerung der Meßgenauigkeit erfordert eine Erhöhung der insgesamt registrierten Impulszahl, um den statistischen Fehler zu verringern. Dies läßt sich je nach Anwendung durch eine Vergrößerung der Meßzeit pro Meßpunkt oder durch eine Steigerung der Impulsrate erreichen.

Die Einsatzzeit für eine klinische Überwachung erfordert bei gegebenem Feasibility Index und begrenzter Laserleistung zu-

sätzlich eine Kompensation der Drift verschiedener Meßgeräteparameter. In Frage kommt das Verfahren, normierte Konzentrationswerte zu bestimmen, das bei der Diskussion klinischer Gasmessungen mit einem Massenspektrometer bereits erwähnt wurde und das z.B. auch von SCHWIESOW, DERR (L59) zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre mit einer Genauigkeit von 10^{-6} vorgeschlagen wird. Ist die zulässige Meßzeit pro Meßpunkt durch die geforderte zeitliche Auflösung vorgegeben und die verfügbare Laserleistung durch die Forderung eines geringen technischen Aufwandes eingeschränkt, so läßt sich die Nachweisempfindlichkeit nur durch eine Erhöhung des Feasibility Index steigern. Dies erfordert, wie bei der Analyse der Rotationsspektren, den Einsatz eines "lichtstarken" Spektralapparates, dessen spektrale Eigenschaften denen der Schwingungsspektren angepaßt sind. Eine Optimierung erfolgte mit Hilfe einer Interferenzfilterkombination, die als Polychromator zur Simultanregistrierung verschiedener Mischungsbestandteile geeignet ist. Abb. 49 zeigt die spektrale Lage der Schwingungslinien und der Transmissionsbereiche der gasspezifischen Interferenzfilter.

Die optische Nachweisempfindlichkeit des CARY 82 für die mit λ_o = 488 nm angeregten Schwingungslinien von O_2 und N_2 beträgt $1{,}2(4).10^{-3}$ bzw. $0{,}9(3)\cdot10^{-3}$. Die Transmission der Filterkombination von 0,4 zusammen mit der Quantenausbeute von 25 % eines blauempfindlichen Fotomultipliers läßt eine optische Nachweisempfindlichkeit von 0,1 erwarten. Dies entspricht einer Steigerung des Feasibility Index um einen Faktor 10^2; gleichzeitig ergibt die Simultanregistrierung die Möglichkeit zur Messung normierter Konzentrationswerte, die weitgehend unabhängig von der Drift der Nachweisempfindlichkeit des Meßsystems sind.

Optimierung des Feasibility Index

Die Registrierung der Rotations-RAMAN-Spektren und der Schwin-

gungs-RAMAN-Spektren mit dem Spektrometer CARY 82 ergab zwei Werte des Feasibility Index, die sich um eine Größenordnung unterscheiden. Eine Erhöhung von X um 2 - 4 Größenordnungen

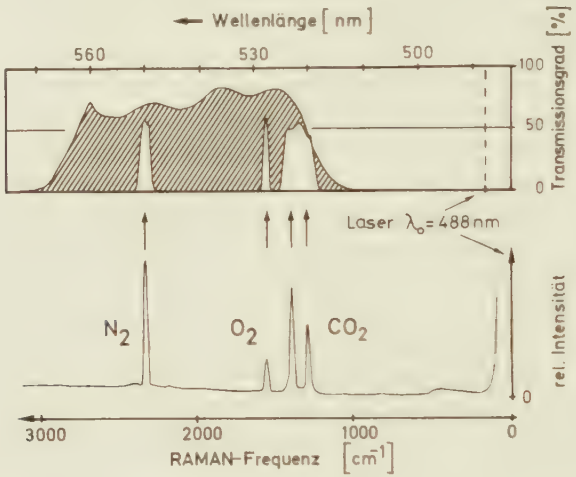


Abb. 49: Vergleich eines Schwingungs-RAMAN-Spektrums einer atemgasähnlichen Mischung und der spektralen Lage und Form der Transmissionsbereiche entsprechender Interferenzfilter (Daten Tab. 5).
Der Transmissionsverlauf der einzelnen gasspezifischen Filter wird durch das Produkt der Transmission der Einzelfilter und des gemeinsamen Filters bestimmt. Der schraffierte Bereich entspricht dem Transmissionsbereich des breitbandigen Filters zur Streulichtvorzerlegung.

läßt sich durch eine Anpassung des Spektralapparates an die Eigenschaften des benutzten Spektrentyps erreichen. Darüberhinaus kann durch die Gestaltung des Beleuchtungsstrahlenganges, der Streuanordnung und der Streuküvette der Feasibility Index weiter erhöht werden. Die in Tab. 11 angegebenen Zahlenwerte der Einzelfaktoren von M beziehen sich auf Angaben verschiedener Autoren und auf typische Meßwerte für das Spektrometer CARY 82, wobei der angegebene Variationsbereich durch Messungen in größeren zeitlichen Abständen bedingt ist.

Eine Optimierung der Meßanordnung läßt sich durch die Streuung im Laserresonator oder in einer Multipassküvette erreichen.

	Bezugsystem (CARY 82)		Steigerung	Autor
Frequenzfaktor q:				
Laserwellenlänge:	(488,0 nm)		(337 nm)	
q^4	1		5,1	
Multipassfaktor M = $\prod_i M_i$:				
Lichtquelle:				
Intensität: I/I_o (I_o= 1 W)	1		intra cavity 40(4) 40-60 100	d.A. (L59) (L52)
Vorzerlegung:	0,3-0,5	d.A.	0,9-1,0	d.A.
Streuanordnung:				
fokussiert	2		2	(L51)
fok. + Multipass	10-12	d.A.	16-18	(L51)
fok. + Multipass + intra cavity	-		80	(L51)
externer Resonator	- .		100	(L60)
Gasküvette	0,6-0,8	d.A.	1	d.A.
Rückstreuspiegel	1,8-1,0	d.A.	1,9	d.A.
Multipass-Faktor M:	2 - 8		$>2\cdot10^2$	
Streulänge [cm]	o,5		2-10	d.A.
Flächenfaktor	0,1- 1,0	d.A.	1	

Tab. 11: Optimierungmöglichkeiten des Feasibility Index durch eine Veränderung der Meßsystemparameter in verschiedenen Streuanordnungen; Angaben nach Ergebnissen dieser Arbeit (d.A.) und verschiedener Autoren

Der Multipassfaktor erhöht sich dadurch von M = 2-8 auf $M > 10^2$. Bei einer Anwendung eines FABRY-PEROT-Interferometers oder des Interferenzfiltersystems errechnet sich ein Feasibility Index $X = 10^{-10} - 10^{-9}$. Dies entspricht einer gasspezifischen Impulsrate von ca. 10^9 Imp./s für 100 Vol.% N_2 oder O_2 und eine Laserleistung I_o = 1 W bei λ_o = 488 nm.

Eine Meßunsicherheit kleiner 0,1 Vol.% und eine zeitliche Auflösung von 0,1 s stellen die Vergleichswerte der massenspektrometrischen Gasanalyse dar. Unter der Voraussetzung, daß die Intensitätsschwankungen nur durch die statistischen Schwankungen des RAMAN-Streulichts allein verursacht werden und keine Fluoreszenz auftritt, erfordert diese Meßgenauigkeit die Registrierung von mindestens 10^4 Impulsen in 0,1 s. Dies erfordert eine Laserleistung von I_{omin} = 1 mW. Damit wird ein luftgekühlter Ar^+-Laser mit einer Ausgangsleistung von ca. 10 mW den Anforderungen gerecht.

Die Steigerung der Meßgenauigkeit und der Nachweisempfindlichkeit ist bei konstantem Feasibility Index durch eine Erhöhung der Laserleistung möglich; die Auswahl des verwendeten Lasertyps bestimmt einen wesentlichen Teil des technischen Aufwandes und ermöglicht eine Anpassung an die verschiedenen Forderungen der klinischen Anwendungen, wie Überwachung in der Intensivpflege und während einer Operation sowie Einsatz zur Lungenfunktionsdiagnostik.

Bestimmung der Atemgaskonzentrationen

Voraussetzung für eine klinische Anwendung ist die Optimierung des Spektralapparates zur Zerlegung des Streulichts, die bei der Registrierung der Schwingungsspektren mit einer Verringerung des technischen Aufwandes verbunden ist. Der in 4.4 beschriebene Meßaufbau nutzt die gasspezifischen Interferenzfilter zur Streulichtzerlegung aus und zeigt experimentell die Steigerung des Feasibility Index bei einer gleichzeitigen Verringerung des Aufwandes.

Die erreichbare Genauigkeit und zeitliche Auflösung mit einem einfachen Meßaufbau wurden durch die Registrierung des zeitlichen Verlaufs der Atemgaskonzentrationen veranschaulicht. Der Meßaufbau entspricht der in Abb. 16 und 17 dargestellten

und in 4.4 beschriebenen Anordnung. Abb. 50 gibt die mit Zeitkonstanten von 0,3-0,5 s registrierten Konzentrationsänderungen wieder; die Eichung erfolgte mit Hilfe reiner Gase und Luft.

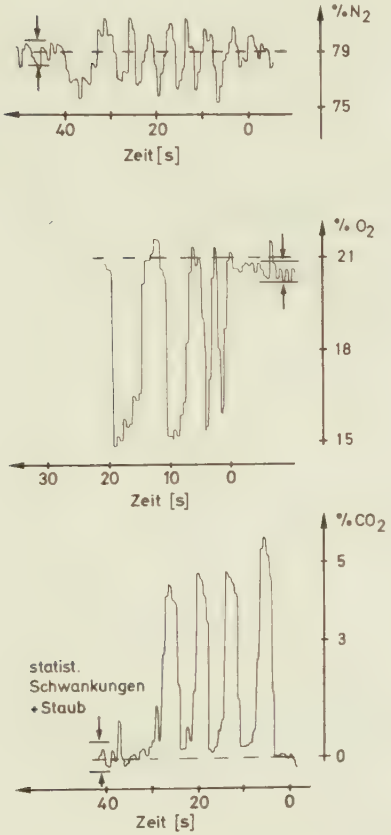


Abb. 50:

Zusammenstellung der einzeln registrierten zeitlichen Konzentrationsänderungen der Atemgasbestandteile im Rhythmus der Atmung.
Die partielle Nachweisempfindlichkeit wurde mit verschiedenen Eichgasen und mit Luft ermittelt.
Küvettentemperatur: 310-320 K, λ_o= 488 nm, Streulichtzerlegung durch Interferenzfilter

Die Intensitätsschwankungen entstanden durch statistische Schwankungen und durch Staub in der Umgebungsluft. Schwankungen der N_2-Konzentration lassen sich zusätzlich durch die exspiratorische Volumänderung als Folge des respiratorischen Quotienten <1 und des Wasserdampfgehalts der Ausatemluft er-

klären. Außerdem können bei diesem Versuchsaufbau kleine Bewegungen der Spiegel im Luftstrom zu den Intensitätsschwankungen beitragen.

Technisch einfach läßt sich eine Normierung der Intensitäten bei der Atmung von Umgebungsluft mit Hilfe der inspiratorischen

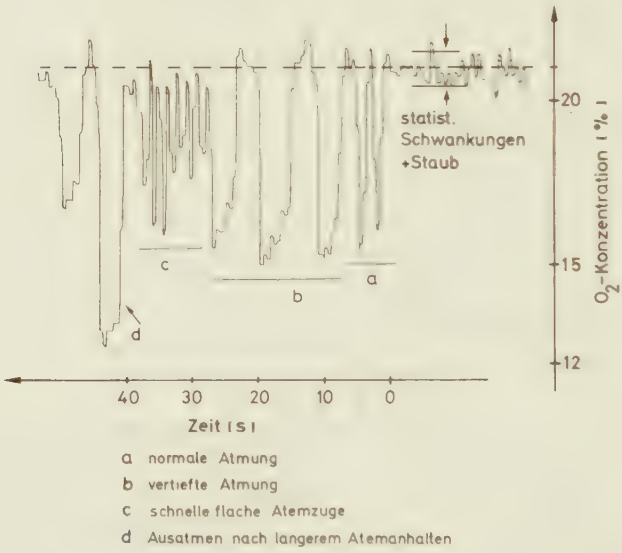


Abb. 51: Verlauf der O_2-Konzentration in der Atemluft bei einer unterschiedlichen Atmungstiefe und Atemfrequenz. Die Eichung erfolgte mit reinem O_2- und N_2-Gas sowie mit Luft.
Küvettentemperatur: 310-320 K, λ_o= 488 nm, Streulichtzerlegung durch Interferenzfilter

N_2-Konzentration erreichen. Die zeitliche Auflösung gestattet aus den in- und exspiratorischen Konzentrationsdifferenzen die Bestimmung des respiratorischen Quotienten, der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidabgabe.
Mit Hilfe der beweglichen Blenden wurde die auftretende

Fluoreszenzstrahlung um einen Faktor 10 reduziert. Der Fehler aus dem Gesamtvolumen der Meßküvette von ca. 30 cm^3 ist gegenüber dem Lungentotvolumen von ca. 150 cm^3 vernachlässigbar und läßt sich durch eine geeignete Geometrie der Streuküvette weiter verringern.

Die bereits mit dieser Meßanordnung erreichbare zeitliche Auflösung und Nachweisempfindlichkeit lassen sich anhand der Abb. 51 veranschaulichen, in der der zeitliche Verlauf der O_2-Konzentration bei verschiedener Atmungstiefe und Atemfrequenz wiedergegeben wird.
Der Feasibility Index beträgt je nach Fotomultipliertyp $X = 10^{-13} - 10^{-12}$ und entspricht damit einer Steigerung um $10 - 10^2$ gegenüber der Registrierung der Schwingungsspektren mit dem Spektrometer CARY 82.

6. DISKUSSION

Das Ziel dieser Untersuchungen zur Anwendung der RAMAN-Streuung in den natürlichen Körperflüssigkeiten sowie in Atem- und Narkosegasmischungen lag in der Klärung der Frage, inwieweit sich dieses Analyseverfahren für die kontinuierliche in vivo Überwachung der Konzentrationen bestimmter Stoffwechselprodukte einsetzen läßt. Dazu wurden die Möglichkeit einer hinreichenden Abtrennung der Störsignale, die Identifizierung der einzelnen Substanzen in Mischungen und die Bestimmung der "physiologischen" Konzentrationen, bzw. deren "pathologischen" Abweichungen mit dem Spektrometer CARY 82 untersucht.

Um die Diskussion der Ergebnisse und die Optimierung des Meßgeräts für die verschiedenen klinischen Anwendungen von den Eigenschaften des als Bezugssystem verwendeten Spektrometers zu trennen, wurde in die vorliegenden Betrachtungen der Feasibility Index eingeführt, der den meßsystem- und substanzspezifischen Einfluß auf das Meßsignal beschreibt. In Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung dieser Größe dahingehend erweitert, daß sie alle intensitätsbeeinflussenden Parameter einer Meßanordnung erfaßt; ausgenommen ist nur der Einfluß der Anregungsfrequenz in Form eines zusätzlichen Frequenzfaktors. Mit Hilfe des Feasibility Index lassen sich für die einzelnen Substanzen und Meßanordnungen die Meßgenauigkeit und zeitliche Auflösung in Abhängigkeit von der Konzentration und von der Laserleistung berechnen sowie die Verbesserungen durch eine Weiterentwicklung diskutieren.

Die diagnostisch interessanten Stoffwechselprodukte besitzen charakteristische Spektren; für die Konzentrationsbestimmung lassen sich intensive RAMAN-Linien ausnutzen. Die Streuintensität von Mischungsbestandteilen konstanter Konzentration oder die Intensität von gemeinsamen RAMAN-Linien, die als Maß für

die Gesamtkonzentration dienen, können zur Kompensation intensitätsbeeinflussender Effekte eingesetzt werden.

Wegen der intensiven Fluoreszenz bei der Lichtstreuung in den Körperflüssigkeiten wurden verschiedene Verfahren zur Überwindung dieser Störung diskutiert, von denen aufgrund des technischen Aufwandes nur die Anwendung eines Membrankatheters praktische Bedeutung besitzt. Für eine kontinuierliche Überwachung der wichtigsten Stoffwechselprodukte reichen beim Vorliegen wässriger Lösungen die ermittelten Nachweisgrenzen aus; der Feasibility Index z.B. für den Nachweis einer physiologischen Harnstoffkonzentration (Serum, ca. 6 mMol/l) beträgt ca. 10^{-15}.

Bei der direkten Bestimmung der Sauerstoffsättigung und bei der Atemgasanalyse gelang der Nachweis physiologischer Konzentrationen direkt in den natürlichen Mischungen in Form normierter Meßwerte.
Die Resonanzverstärkung der RAMAN-Streuung an strömendem Citratblut führte zu Intensitäten in der Größenordnung der Fluoreszenzintensität; der Feasibility Index beträgt ca. 10^{-14}. Die Bestimmung der Sauerstoffsättigung gelang aus einem Meßsignal für die Konzentration des Oxyhämoglobins und einem zusätzlichen Signal für die Hämoglobingesamtkonzentration.

Für klinische Bestimmungen an einem extrakorporalen Kreislauf dürften die Ergebnisse dieser in vitro Messungen von Bedeutung sein. Intravasale Messungen erfordern darüberhinaus die Entwicklung eines Lichtleitkatheters, dessen technische Problemstellung den Rahmen dieser Arbeit überschreitet. Die störenden Intensitätsänderungen der Fluoreszenz werden durch Temperatur-, Oxygenationsgrad- und Strömungsgeschwindigkeitsänderungen verursacht. Temperaturänderungen sind bei klinischen in vivo Messungen gering; der Einfluß der Oxygenationsgradänderungen läßt sich durch eine Streuanregung in einem

Bereich gleicher Extinktion beider Hämoglobinformen reduzieren. Die Intensitätsschwankungen durch eine pulsative Strömung des Blutes, z.B. im arteriellen System, erfordern einen zusätzlichen Meßkanal und eine Unterdrückung der Intensitätsänderung nach Art einer Differenzmessung.

Bei den Gasanalysen wurde über die grundlegenden Untersuchungen hinaus die Konzeption eines Meßgeräts für eine klinische Anwendung entwickelt. Die erzielte zeitliche Auflösung und Nachweisempfindlichkeit einer einfachen Meßanordnung mit gasspezifischen Interferenzfiltern zur Streulichtzerlegung konnten durch die Registrierung des zeitlichen Verlaufs der einzelnen Atemgaskonzentrationen im Atemrhythmus als in vivo Messung demonstriert werden. Für eine Simultanregistrierung mehrerer Streulichtkomponenten wurde ein "lichtstarker" Interferenzfilterpolychromator aufgebaut, dessen spezifische Transmissionsgrade durch die zweifache Durchstrahlung denen der Einzelfilter entsprechen.

In Hinblick auf eine klinische Anwendung wurden die Optimierungsmöglichkeiten des Meßsystems durch technische Veränderungen untersucht, der erreichbare Feasibility Index beträgt ca. 10^{-9}. Der Übergang vom Spektrometer CARY 82 zur Meßanordnung mit Interferenzfiltern ist mit einer Verringerung des Aufwandes und gleichzeitig mit einer Steigerung des Feasibility Index von 10^{-14} beim CARY 82 um zwei Größenordnungen verbunden. Von entscheidender Bedeutung sind darüberhinaus Multipassverfahren zur Erhöhung des Feasibility Index, um den technischen Aufwand weiter zu senken und einen breiten klinischen Einsatz für die Überwachung in der Intensivpflege zu ermöglichen.

Die Anwendungsmöglichkeiten der RAMAN-Spektroskopie waren auch in der Vergangenheit jeweils von den Eigenschaften und

dem technischen Entwicklungsstand der einzelnen Komponenten des Meßgeräts bestimmt, wie am Beispiel der Registrierzeiten des Diäthylätherspektrums gezeigt wurde. Die Weiterentwicklung der Laserlichtquellen, der fotoelektrischen Detektoren, der Spektralapparate und verschiedener Multipassverfahren lassen für die Zukunft eine Verbesserung der Meßsystemeigenschaften erwarten, die sich auf den Feasibility Index, die zeitliche Auflösung, den technischen Aufwand und die störungsfreie Betriebszeit eines Meßgeräts auswirken werden.
In Verbindung mit Verfahren zur Unterdrückung der Fluoreszenzstrahlung und der Entwicklung von Meßkathetern bestehen für die RAMAN-Spektroskopie in der klinischen Diagnostik und Überwachung zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, für die die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage bilden.

LITERATUR

(L1) RAMDAS,L.A.
Indian J. Physics Proc. Indian Assoc. Cultivat. Sci.
3, 131 (1928).

(L2) LAPP,M., C.M.PENNEY
Laser RAMAN Gas Diagnostics
Plenum Press (New York-London 1974).

(L3) SCHRADER,B.
Angew. Chem. 85, 925 (1973).

(L4) GROSSMAN,W.E.L.
Anal. Chem. 46, 345R (1974).

(L5) FREEMAN,S.K.
Applications of Laser Raman Spectroscopy
John Wiley & Sons (New York-London-Sydney-Toronto 1974).

(L6) WILLIS,J.N.Jr., R.B.COOK, R.JANKOW
Anal. Chem. 44, 1228 (1972).

(L7) CAREY,P.R., A.FROESE, H.SCHNEIDER
Biochem. 12, 2198 (1973).

(L8) PLACZEK,G.
Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt,
in: E.MARX, Handbuch der Radiologie Bd.IV, Teil III,
205 (Leipzig 1934).

(L9) BRANDMÜLLER,J., H.MOSER
Einführung in die Ramanspektroskopie
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag (Darmstadt 1962).

(L10) GILSON,T.R., P.J.HENDRA
Laser Raman Spectroscopy
John Wiley & Sons (New York-London-Sydney-Toronto 1970).

(L11) FENNER,W.R., H.A.HYATT, J.M.KELLAM, S.P.S.PORTO
J. Opt. Soc. Amer. 63, 73 (1973).

(L12) PENNEY,C.M., R.L.St.PETERS, M.LAPP
J. Opt. Soc. Amer. 64, 712 (1974).

(L13) SAILER,D., G.BERG, F.MATZKIES
Biomed. Technik 19, 134 (1974).

(L14) ADAMS,A.P., C.E.W.HAHN
Bio-Med. Eng. 8, 10 (1973).

(L15) KOENIG,J.L.
J. Polymer Sci.-Part D, 59 (John Wiley & Sons 1972).

(L16) MINDT,W., P.RACINE, P.SCHLÄPFER
Ber. Bunsen Ges. 77, 804 (1973).

(L17) WALD,A., W.K.HASS, J.RANSOHOFF
J. Assn. Advan. Med. Instrum. 5, 325 (1971).

(L18) SPIRO,T.G.
Accounts chem. research 7, 339 (Washington 1974).

(L19) KESSLER,M., D.F.BRULEY, L.C.CLARK Jr., D.W.LÜBBERS, I.A.SILVER, J.STRAUSS
Oxygen supply, Theoretical and Practical Aspects of Oxygen Supply and Microcirculation of Tissue
Urban & Schwarzenberg (München-Berlin-Wien 1973).

(L20) PIIPER,J.
Physiologie der Atmung
in: O.H.GAUER, K.KRAMER, R.JUNG, Physiologie des Menschen, Bd. 6, Urban & Schwarzenberg (München-Berlin-Wien 1972).

(L21) LEONARD,P.F.
Medical Engineering in Anesthesiology
in: C.D.RAY, Medical Engineering, Chapt. 30, 345
Year Book Medical Publishers (Chicago 1974).

(L22) COLE,J.S., W.E.MARTIN, P.W.CHEUNG, C.C.JOHNSON
Amer. J. Card. 29, 383 (1972).

(L23) KLEIMAN,B.S., O.BRANTIGAN, A.ZAPATA
J. Assn. Advan. Med. Instrum. 5, 224 (1971).

(L24) SHRIVER,D.F., J.B.R.DUNN
Appl. Spectrosc. 28, 319 (1974).

(L25) HESS,W.R., H.HACKER, H.W.SCHRÖTTER, J.BRANDMÜLLER
Z. f. angew. Physik 27, 233 (1969).

(L26) NAFIE,L., P.STEIN, B.FANCONI, W.L.PETICOLAS
J. Chem. Phys. 52, 1584 (1970).

(L27) PETICOLAS,W.L., L.NAFIE, P.STEIN, B.FANCONI
J. Chem. Phys. 52, 1576 (1970).

(L28) DE VOS, J.C.
Physica XX, 669 (1954).

(L29) ZIESSOW,D.
On-line Rechner in der Chemie
De Gruyter (Berlin-New York 1973).

(L30) SUNDIUS,T.
J. Raman Spectrosc. 1, 471 (1973).

(L31) DAVIS,A.R., D.E.IRISH, R.B.RODEN, A.J.WEERHEIM
Appl. Spectrosc. 26, 384 (1972).

(L32) KARGER,A.M., R.P.ENGLISH, R.J.D.SMITH
Appl. Optics 12, 2083 (1973).

(L33) LORD,R.C., N.T.YU
J. Mol. Biol. 50, 509 (1970).

(L34) LORD,R.C., G.J.THOMAS,Jr.
Spectrochim. Acta 34A, 2551 (1967).

(L35) BEGLEY,R.F., A.B.HARVEY, R.L.BYER, B.S.HUDSON
Intern. Lab., 11 (1975).

(L36) BRUNNER,H., H.SUSSNER
Biochim. Biophys. Acta 310, 20 (1973).

(L37) BULKIN,B.J.
Biochim. Biophys. Acta 274, 649 (1972).

(L38) SPIRO,T.G., T.C.STREKAS
J. Amer. Chem. Soc. 96, 338 (1974).

(L39) LEWIS,A., J.SPOONHOWER
Tunable Laser Resonance Raman Spectroscopy in Biology
in: S.-H.CHEN, S.YIP, Spectroscopy in Biology and
Chemistry, Neutron, X-ray, Laser
Academic Press (London 1974).

(L40) LAING,R.A., L.A.DANISH, L.R.YOUNG
IEEE Transact. BME-22, 183 (1975).

(L41) BETKE,K.
Das Hämoglobin und die Hämoglobinanomalien,
in: H.SCHWIEGK, Handbuch der Inneren Medizin, Bd.II,
Teil I, Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg-New York 1968).

(L42) ALBRECHT,A.C.
J. Chem. Phys. 34, 1476 (1961).

(L43) COLLINS,D.W., D.B.FITCHEN, A.LEWIS
J. Chem. Phys. 59, 5714 (1973).

(L44) SPIRO,T.G., T.C.STREKAS
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2622 (1972).

(L45) YAMAMOTO,T., G.PALMER, D.GILL, I.T.SALMEEN, L.RIMAI
J. Biol. Chem. 248, 5211 (1973).

(L46) STREKAS,T.C., T.G.SPIRO
J. Raman Spectrosc. 1, 387 (1973).

(L47) WOODRUFF,W.H., D.H.ADAMS, T.G.SPIRO, T.YONETANI
J. Amer. Chem. Soc. 97, 1695 (1975).

(L48) TOMIMATSU,Y., S.KINT, J.R.SCHERER
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1067 (1973).

(L49) PLACZEK,G., E.TELLER
Z. Physik 81, 209 (1933).

(L50) HERZBERG,G.
Molecular Spectra and Molecular Structure II.
Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules,
Van Nostrand Reinhold Comp. (New York-Cincinnati-
Toronto-London-Melbourne 1945).

(L51) WEBER,A., S.P.S.PORTO, L.E.CHEESMAN, J.J.BARRETT
J. Opt. Soc. Amer. 57, 19 (1967).

(L52) HICKMAN,R.S., L.LIANG
Appl. Spectrosc. 27, 425 (1973).

(L53) BARRETT,J.J., S.A.MYERS
J. Opt. Soc. Amer. 61, 1246 (1971).

(L54) SMITH,W.H.
A New Method for the Detection of Raman Scattering from Atmospheric Pollutants
in: J.P.MATHIEU, Advances in Raman Spectroscopy, Vol.1, Heyden & Son Ltd. (London 1973).

(L55) FOUCHE,D.G., R.K.CHANG
Appl. Phys. Letters 18, 579 (1971).

(L56) FOUCHE,D.G., R.K.CHANG
Appl. Phys. Letters 20,256 (1972).

(L57) PENNEY,C.M., L.M.GOLDMAN, M.LAPP
Abstract, Opt. Soc. Amer. Spring Meeting (1972).

(L58) HORNISCHER,R., H.MOSER
Spectrochim. Acta 28A, 81 (1972).

(L59) SCHWIESOW,R.L., V.E.DERR
J. Geophys. Res. 75, 1629 (1970).

(L60) HILL,R.A., D.L.HARTLEY
Appl. Optics 13, 186 (1974).

(L61) NESTOR,J., T.G.SPIRO
J. Raman Spectrosc. 1, 539 (1973).

(L62) CAREY,P.R., H.SCHNEIDER, H.J.BERNSTEIN
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 588 (1972).

(L63) KELLER,H.
Biomed. Technik 19, 129 (1974).

(L64) SZABO,A., L.D.BARRON
J. Amer. Chem. Soc. 97, 660 (1975).

VERWENDETE SYMBOLE

A(p), B(dp), C(ap) D(p), E(p), F(dp)	Bezeichnung der Resonanz-RAMAN-Linien der Häm-Gruppe
A_0-A_3, B_0-B_3 D_0-D_3, D'_0-D'_3	Bezeichnung der vierstelligen BCD-Zahlen
A_i	Analysatorrichtung (i= x,y,z)
A_{1g},A_{2g},B_{1g},B_{2g}	Symmetrie-Rassen von Schwingungen
B, B_o	Rotationskonstante
c_o	Lichtgeschwindigkeit (Vakuum)
D, D_o	Zentrifugalkonstante
D_{4h}	Symmetrie einer Punktgruppe (Häm-Gruppe)
d	Plattenabstand
E, E_1- E_7	spektrale Nachweisempfindlichkeit (CARY 82)
e	Hauptquantenzahl
f	elektr. Frequenz [Hz]
F_b, F_z	Spaltbildbreite, Strahltaille
F_J	Besetzungswahrscheinlichkeit
F(ν)	GAUSS-LORENTZ-Produktfunktion mit den Parametern A', B', C', D', E', F'
G, (F_c)	Flächenfaktor
h	PLANCKsches Wirkungsquantum
I, I_R	RAMAN-Gesamtintensität
I_o	Laserintensität
I(ν)	Intensitätsverlauf
I_u(ν)	Intensitätsverlauf des Untergrundes
I_x,I_y,I_a,I_b,$I_\parallel$,$I_\perp$	Streulichtkomponenten
I_L	Intensität der Lampe
I_m	Maximalintensität
I_F	integrierte Intensität
J	Drehimpulsquantenzahl
k	ganze Zahl (Interferenzordnung)
k_o	BOLTZMANN-Konstante
L	Streulänge
L_y, L_z	Polarisationsrichtung der Laserstrahlung

M	Multipassfaktor
N	Molekülzahl
N_H, N_D	Impulszahl, Hellwert bzw. Dunkelwert
n	Kanalzahl
q	Frequenzfaktor des Laserlichts
s	spektrale Bandbreite
T	absolute Temperatur
T_g	spezifischer Transmissionsgrad
v	Schwingungsquantenzahl
V	Streuvolumen
X	Feasibility Index
x, y, z	Koordinaten
(a'_{ij})	Komponenten des RAMAN-Tensors
$\overline{a'}^2$, γ'^2	Tensorinvarianten
Δ	Winkel des Polarisationsdrehers
$\Delta\lambda$	Breite des Transmissionsbereichs
ν, ν_{nm}	RAMAN-Frequenz $[cm^{-1}]$
$\tilde{\nu}$, $\tilde{\nu}_{nm}$	RAMAN-Frequenz $[1/s]$
ν_o, $\tilde{\nu}_o$	Anregungsfrequenz (Laser-)
ν_m	RAMAN-Frequenz (Linienmaximum)
ν_e	Frequenz der elektronischen Absorptionsbande
ν_k	Frequenz des Transmissionsbereichs
ν_L, λ_L, $d\sigma_L/d\Omega$	Bezugswerte für den Feasibility Index
λ_o	Laserwellenlänge
μ	effektiver Brechungsindex
λ_m	Mittenwellenlänge
$d\sigma/d\Omega \triangleq \sigma$	diff. Streuquerschnitt
σ_{eff}	effektiver diff. Streuquerschnitt
Ω	Raumwinkel der Streulichterfassung
ρ_s	Depolarisationsgrad für linear polarisiertes Laserlicht
θ	Transmissionswinkel
τ_1, τ_2	Zeitkonstanten

Teile der vorliegenden Dissertation sind in folgenden Vorträgen bereits veröffentlicht worden:

(a) ALBRECHT,H., R.BLASER, R.THULL, M.SCHALDACH
"Laser RAMAN Spectroscopy in a Lactate - Pyruvate System"
X. International Conference on Medical and Biological Engineering, Dresden 1973.

(b) ALBRECHT,H., M.SCHALDACH
"RAMAN-spektroskopische Gas-Partialdruckbestimmung für eine kontinuierliche Überwachung der Blut- und Atemgase"
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Stuttgart 1975.

Herrn Prof. Dr.-Ing. M. Schaldach bin ich für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Für wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie für ihre Mithilfe danke ich den Herren Prof. Dr. D. Breitinger, Priv.-Doz. Dr.-Ing. G. Müller, Dr.-Ing. R. Blaser, Dr.-Ing. F. Hein, Dr. U. Kristen und Dipl.-Phys. J. Nagel.

Für die Bereitstellung der Substanzen und zusätzlicher Geräte danke ich den Leitern der betreffenden Institute der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, insbesondere Herrn Prof. Dr.-Ing. H. Behrens und Herrn Prof. Dr. K. Brodersen.

LEBENSLAUF

Am 16. 10. 1942 wurde ich als Sohn des Konstrukteurs Wilhelm Albrecht und seiner Ehefrau Lina Albrecht, geb. Ahner, in Stuttgart geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Rosenau-Schule und von 1953 bis 1962 das Robert-Mayer-Gymnasium in Heilbronn, wo ich am 14. 3. 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem halbjährigen Praktikum bei der Fa. A. Läpple in Heilbronn studierte ich vom Wintersemester 1962/63 bis Wintersemester 1964/65 Physik an der Technischen Hochschule Stuttgart. Vom Sommersemester 1965 bis Wintersemester 1968/69 setzte ich das Physikstudium an der Universität Hamburg fort. Die Diplomarbeit "Untersuchungen an einer Quelle für polarisierte Lithiumionen" fertigte ich im Physikalischen Staatsinstitut, 1. Institut für Experimentalphysik, bei Herrn Prof. Dr. H. Neuert an und beendete das Studium mit der Diplomhauptprüfung am 2. 5. 1969.

Vom 1. 9. 1969 bis 30. 9. 1971 war ich als Entwicklungs-Ingenieur und stellvertretender Laborleiter in der Fachabteilung Angewandte Elektronik der Fa. AEG-TELEFUNKEN in Berlin tätig.

Seit dem 1. 10. 1971 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter im Department für Biomedizinische Technik, seit dem 15. 11. 1974 Zentralinstitut für Biomedizinische Technik, der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg beschäftigt.

Offsetdruck-Fotodruck
J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990